

Univerzita Karlova v Praze
1. Lékařská Fakulta

Studijní program: Postgraduální studium v biomedicině

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

**Ovlivnění pooperační analgésie typem předoperační a
pooperační medikace a její objektivní hodnocení**
Experimentální a klinická studie

**The influence on postoperative analgesia by preemptive
analgesia and its objective evaluation**
Experimental and clinical study

Disertační práce
MUDr. Jitka Fricová

Vedoucí závěrečné práce, školitelé:
Doc. MUDr. Martin Stříteský, CSc
Prof. MUDr. Richard Rokyta, DrSc

Datum obhájení práce:
16.12.2010

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze

Souhlasím – ~~Nesouhlasím~~

*

V Praze, 6.10.2010

Jitka Fricová

Podpis

Autor: MUDr.Jitka Fricová

Školitel:Doc.MUDr.Martin Stříteský, CSc.

Školitel- specialista:Prof.MUDr.Richard Rokyta, DrSc.

Řešitelská pracoviště:

Univerzita Karlova, 1.Lékařská fakulta, Všeobecná fakultní nemocnice, Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Praha

Univerzita Karlova, 3.Lékařská fakulta, Ústav normální, patologické a klinické fyziologie, Praha

Akademie věd České republiky, Ústav anorganické chemie, v.v.i., Řež

Poděkování

Děkuji prof.MUDr.Richardu Rokytovi DrSc., bez jehož pomoci, podpory a trpělivosti by tato práce nikdy nevznikla a nebyla dokončena. Pan profesor se s celým týmem Ústavu normální, klinické a patologické fyziologie podílel neúnavně na organizaci sběru, třídění a interpretace dat této klinické a experimentální studie.

Velký dík patří MUDr.Martinu Vejražkovi PhD. z 1.Lékařské Fakulty UK, Ústavu lékařské chemie a biochemie, který se aktivně podílel na sběru, měření a vyhodnocení dat všech biochemických metod.

Díky RNDr. Jaromíru Běláčkovi z 1.Lékařské Fakulty UK, Ústavu biofyziky a informatiky za precizní statistické zpracování a interpretaci všech nasbíraných dat.

Děkuji Ing. Pavlu Stopkovi CSc. z Akademie věd České republiky, Ústavu anorganické chemie, v.v.i., Řež za měření volných radikálů pomocí přímé metody EPR.

Děkuji doc.MUDr.Martinovi Stříteskému CSc. z 1.Lékařské Fakulty UK, Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny za velkou pomoc a podporu během celého studia a za vytvoření příznivých podmínek pro realizaci celé studie.Poděkování patří také d.s. Ivě Vojáčkové, staniční sestře z Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny za provedení všech odběrů pacientům v klinické části studie.

Obsah

Souhrn

Summary

1. Cíle studie

2. Úvod

2.1.Oxidační stres, volné radikály a antioxidanty

2.2.Bolest

2.3.Bolest a antioxidanty u laboratorních potkanů

2.4.Bolest a stres

2.5.Akutní pooperační bolest

2.6.Opioidní analgezie (Morfin a Pethidin)

2.7.Herniotomie

3. Hypotézy

4. Materiál a metodiky

4.1. Experimentální část studie –laboratorní potkani

4.2. Klinická část studie – pacienti

4.3. Přímé měření volných radikálů -EPR Metodika

4.4. Biochemické metody

4.5.Statistické metody

5. Výsledky

5.1. Experimentální část

5.2. Klinická část

6. Diskuze

7. Závěry

8. Literatura

9. Seznam vlastních publikací

Seznam zkratek

CRP- C-reaktivní protein

DMPO-5,5- Dimethylpyrrolin N-oxid

EPR-Elektron paramagnetická rezonance

GLM- General Linear Model pro opakovaná měření

GPX- Glutathionperoxidáza

HDL- High-density lipoprotein

LDL-Low density lipoprotein

MDA-Malondialdehyd

NADPH- Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

PBN-Phenyl-Tert-Butylnitrone

RNS- reactive nitrogen species

ROS-reactive oxygen species

SOD- superoxiddismutáza

SPSS- Statistical Package for the Social Sciences

TBARS- Thiobarbituric Acid Reactive Substances

VAS-Vizuální analogová škála

Souhrn

Naším cílem bylo posoudit změny volných radikálů a dalších biochemických ukazatelů po nociceptivní stimulaci u různých experimentálních animálních modelů. U pacientů jsme zjišťovali, zda preemptivní analgezie má pozitivní účinek na akutní pooperační bolest. Objektivní hodnocení intenzity bolesti je dlouhodobý problém, protože objektivizace pomocí elektrofyziologických a zobrazovacích metod je v současné době náročná a drahá, a proto se v laboratořích v České republice a mnoha dalších místech provádí hodnocení pomocí biochemických metod.

Realizovali jsme velké experimentální studie s použitím mechanické, zánětlivé a viscerální nocicepce a zjistili jsme, že zejména, hydroxylové a nitroxidové volné radikály a singletový kyslík se výrazně zvýšily bolestivé nociceptivní stimulaci. Toto zvýšení může být potlačeno antioxidanty. Současně jsme prokázali, že některé parametry metabolismu lipidů, sacharidů a bílkovin byly rovněž změněny. Měřili jsme zejména volné hydroxylové radikály a singletový kyslík metodou EPR v ocase živých a anestezovaných laboratorních potkanů. Tato metoda je zcela prioritní a nebyla nikdy před tím použita. Již dřívější experimentální výsledky byly částečně ověřeny s použitím různých typů akutní a chronické bolesti u lidí (akutní pankreatitida, zlomeniny, cholecystitida, bolesti viscerálního původu a bolestí dolních zad). Všechny tyto bolestivé syndromy mají různé biochemické změny.

Naším dalším cílem bylo nalézt nejúčinnější analgetickou kombinaci pro efektivní léčbu akutní pooperační bolesti.

Studovali jsme pooperační analgezii a její účinky zahrnující různé typy předoperační a pooperační medikace a její objektivní hodnocení. Zaměřili jsme se na objektivní hodnocení bolesti pomocí různých biochemických parametrů, zejména na volné radikály, které se výrazně měnily během akutní bolesti. Kromě nalezení optimální preemptivní a pooperační analgezie, jsme se pokusili vysvětlit společné mechanismy pooperační bolesti a oxidační stresu. Podařilo se nám objektivizovat biochemické změny při akutní pooperační bolesti na podkladě pooperačního stresu.

Tato studie představuje kombinaci experimentálního přístupu k řešení změn vznikajících při různých typech bolesti a klinické aplikace vlivu preemptivní analgezie na průběh pooperační bolesti.

Summary

The aim of our study was to assess the changes of free radicals and other biochemical parameters after nociceptive stimulation in different experimental animal models. In patients we detected whether preemptive analgesia had a positive effect on acute postoperative pain. Objective evaluation of pain intensity is a long-term problem because the objectification of using electrophysiological and imaging methods is currently difficult and expensive, and therefore in laboratories in the Czech Republic and many other places are used the evaluation by means biochemical methods.

We implemented large experimental studies using mechanical, inflammatory and visceral nociception and we found out in particular that nitroxid and hydroxyl free radicals and singlet oxygen increased significantly after nociceptive stimulation. This increase can be suppressed by antioxidants. At the same time, we showed that some parameters of metabolism lipids, carbohydrates and proteins have also been changed. In particular, we measured the free hydroxyl radicals and singlet oxygen by EPR method in the tail of living and anesthetized rats. This method is absolutely a priority and has never been used before. Earlier experimental results were partially clinically verified using different types of acute and chronic pain in humans (acute pancreatitis, fractures, cholecystitis, the pain of visceral origin and low back pain). In all these pain syndromes are different biochemical changes.

Our next goal was to find the most effective combination for the effective analgesic treatment of acute postoperative pain.

We studied postoperative analgesia and the effects of various types, including preoperative and postoperative medication and its objective evaluation. We focused on an objective assessment of pain using different biochemical parameters, especially the free radicals that are significantly changed during acute pain. It was shown that morphine is the best indication in preemptive analgesia prior to surgery with an expected moderate pain. Morphine in comparison with Pethidine and the group without premedication and the only Morphine significantly reduced levels of free radicals 24 hours after surgery. In the discussion we tried to explain the relationship of postoperative pain and oxidative stress.

This study combines experimental approach to deal with the changes due to the different types of pain and clinical applications of the impact of preemptive analgesia on postoperative pain course.

1. Cíle studie

Objektivní evaluace intenzity bolesti je dlouhodobý problém, protože objektivizace elektrofyziologickými metodami je zatím stále náročná a drahá, proto je na několika pracovištích v České republice a ve světě rozvíjena evaluace metodami biochemickými. Byly provedeny rozsáhlé experimentální studie na modelech mechanické a termické bolesti se zajímavým zjištěním, že zejména volné radikály hydroxylové, nitroxidové a singletový kyslík se po bolestivé stimulaci signifikantně zvyšují. Tuto zvýšenou aktivitu lze potlačit antioxidanty. Zároveň bylo prokázáno, že se také zvyšují některé parametry lipidového, sacharidového a proteinového metabolismu (Rokyta et al., 2003). Tyto experimentální výsledky byly částečně verifikovány u různých typů bolestí akutních i chronických u lidí (akutní pankreatitida, zlomeniny, cholecystitidy, bolesti cévního původu a bolesti zad). (Křikava et al., 2004). Všechny tyto bolestivé syndromy mají různý odraz v biochemických parametrech i u člověka. Dosud nikdy nebyly sledovány změny v pre, peri a pooperačním období.

Primárním cílem studie této části studie optimalizace a zkvalitnění léčby akutní pooperační bolesti s důrazem na preemtivní analgézi. Významným cílem je také snížení intenzity bolesti po všech typech operací. Snaha je nalézt nejvhodnější analgetickou kombinaci k včasné a účinné terapii akutní bolesti, která by ideálně měla začít už v rámci preemtivní analgezie a tudíž v poměrně přesně definovaném čase před operačním výkonem.

Nejprve jsme provedli srovnávací studii na animálních modelech laparotomie (kombinace somatické a viscerální bolesti) s operačním zákrokem u pacientů (herniotomie), u laboratorních potkanů a ještě jsme použili zánětlivou a mechanickou bolestivou stimulaci zadních pacek.

Výsledným cílem byla objektivizace biochemických změn probíhajících na základě akutního pooperačního stresu.

2. Úvod

Dobrá analgezie hraje nezanedbatelnou roli při zlepšování dlouhodobých funkčních výsledků po velkých chirurgických výkonech a má velký význam pro pacienty a následně také pro poskytovatele zdravotní péče (Weill 2009). Nedávné průzkumy naznačují, že akutní až subakutní bolest trvající několik týdnů po operaci představuje další a často opomíjenou oblast klinického výzkumu, s relativně chudými vědeckými daty. Kromě toho poslední vývoj v oblasti fast-tracku a sledování metodiky zdůraznil, že je třeba podstatně zlepšit analgezii k efektivnějšímu využití časné rehabilitace a snížení délky hospitalizace a rekconvalescence.

2.1. Oxidační stres, volné radikály a antioxidanty

Existence volných radikálů byla potvrzena v 60 letech, kdy McCord a Fridovich (1968, 1969) objevili enzym superoxiddismutázu. Pod vedením Fridoviche (McCord a Fridovich 1968) byl použit jaterní extrakt, kde oxidaci sulfitů katalyzuje xantinoxidáza a prostředníkem této reakce je radikál superoxid. Dalším důležitým poznatkem bylo, že radikál nemůže existovat volně, ale že během reakce zůstává vázán na enzym (Holeček et al., 2007).

Následně bylo potvrzeno, že volné radikály jsou obecným metabolitem přítomným v každé buňce a že každá buňka musí být vybavena mechanismy, které brání buňku před reaktivními látkami.

Volné radikály jsou definovány jako molekuly nebo atomy, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů. Většinou jsou volné radikály vysoce reaktivní a snaží se o rychlou vazbu nebo naopak o předání nepárového elektronu. Řetězové reakce probíhají dokud se volný radikál nesetká s antioxidantem. Antioxidant tuto reakci zpomalí nebo úplně zastaví. Radikály jsou jednak neutrální částice, ale také kladné či záporné ionty. Nutné je odlišit reaktivní formy kyslíku ROS (reactive oxygen species) a reaktivní formy dusíku RNS (reactive nitrogen species). Tyto látky jsou schopny působit toxicky a dokonce mohou organizmus poškodit. K pozitivním funkcím těchto látek patří především přenos energie, podílí se na imunitní ochraně a zasahují také na úrovni molekulární buněčné regulace (Holeček et al 2008).

Existují tři cesty, jak může vzniknout volný radikál a to homolytickým štěpením, redukcí a oxidací. Homolyticky je štěpena dvoelektronová vazba a výsledkem je, že každý fragment získá nepárový elektron. Redukce vzniká spojením jednoho elektronu s normální molekulou. Oxidace vzniká ztrátou jednoho elektronu. Celá reakce vzniku volného radikálu může být začátkem dalších reakcí (Štípek 2000). Mezi volné radikály patří z reaktivních forem kyslíku: superoxid, hydroxylový radikál, peroxy, alkoxy, hydroperoxy a z reaktivních forem dusíku oxid dusnatý a oxid dusičitý. Poněkud stranou stojí peroxid vodíku, který není volným

radikálem, ale podílí se na vzniku volných radikálů. Superoxid má oxidační a redukční vlastnosti, podléhá dismutaci a proto je v organismu přítomen enzym superoxiddismutáza. Oxid dusnatý a jeho molekula je vysoce reaktivní, protože reaguje s kyslíkem na výsledný produkt dusitan, který je v organismu vychytáván erytrocyty a pohotově reaguje se železem (Štípek 2000). Vzniká methemoglobin a nitrát a jedná se o neúčinnější způsob inaktivace dusíkového radikálu. Oxid dusnatý se váže na hemové železo, stimuluje syntézu cGMP (cyklický guanosin monofosfát), která způsobuje relaxaci hladké svaloviny cév-vazodilataci. Volné radikály vznikají dvěma způsoby: exogenně a endogenně. K exogenním vlivům, které vyvolají vznik volných radikálů patří X-paprsky, UV světlo, radiace, RTG záření, zplodiny aut, kouření, znečištění vzduchu, ozón, ale také oxidační a psychický stres a některé chemikálie a potraviny. Endogenně vznikají volné radikály při metabolismu některých látek, jako jsou puriny, katecholaminy nebo při vzniku prostaglandinů. Hlavním zdrojem je jednoelektronová oxidace vodíku na vodu. Hlavní cesta a oxidační dráha vede přes cytochromový systém, ale například při sepsi je hlavní cestou právě jednoelektronová oxidace. Velké množství radikálů se také uvolňuje rozpadem fagocytů například v reperfuční fázi po předchozí ischemii, u hyperglykemie, renální nedostatečnosti a dalších patologických stavů.

Volné radikály mají pozitivní efekty v organismu. V bílých krvinkách, makrofázích a zvláště v T-lymfocytech je nahromaděno velké množství volných radikálů, které zabíjejí bakterie, kvasinky, viry a parazity, T lymfocyty a také nádorové buňky.

Singletový kyslík nepatří mezi volné radikály, ale lze jej zařadit mezi ROS (reactive oxygen species) látky. Singletový molekulární kyslík je elektronicky excitovaný stav kyslíku s chemickou reaktivitou (Holeček et al., 2007). Má jeden elektron ve vyšší valenční sféře a tedy má vyšší energetickou hladinu. Poločas jeho trvání je cca 10^{-5} s, ale ve vodném prostředí je delší, zde má schopnost pronikat i přes buněčnou membránu a je velmi reaktivní vůči biomolekulám. Singletový kyslík slouží jako signální látka i jako zbraň proti různým patogenům jako mikrobům, virům, nádorovým buňkám a snad i trombům (Stief 2003).

Singletový kyslík, volný hydroxylový radikál, superoxid a peroxid vodíku jsou klíčové látky i při poškození buněk a endotelu kapilár u akutního zánětu pankreatu (Tadao a Yuji 2004). Nejvíce volných radikálů a ROS látek (především singletového kyslíku a kyseliny chlorné) zneškodňují bílkoviny v buňkách. To, že část oxidovaných proteinů je špatně odbourávána a hromadí se uvnitř buněk, může přispívat k mnoha patologickým stavům (Davies 2005).

Většina vysoce reaktivních oxidantů včetně většiny radikálů reagují s biologickými molekulami jako je DNA, RNA, cholesterol, lipidy, carbohydráty, proteiny a antioxidanty.

Některé méně reaktivní látky, jako peroxidy (např. H_2O_2 , lipidové nebo proteinové peroxidy) působí na cíl více selektivněji a také výsledné poškození závisí na dalších faktorech jako je koncentrace cílové látky, lokalizace cíle nebo přítomnost reakcí scavengerů nebo reakce sloužící k opravování (Davies 2005).

Většina poškozených bílkovin není opravována. Zvláště bývají poškozeny methioninové zbytky, ale i methionin sulfoxid může být za určitých okolností opraven. Zvýšená hladina methionin sulfoxidu byla detekována u krys po expozici ionizujícího záření v srdci, plicích, ledvinách, slezině a jejunu (Fliss 1994). U lidí byl zvýšený methionin sulfoxid naměřen u starých erytrocytů (Seppi 1991), v bronchoalveolární laváži u kuřáků (Costabel 1992), v proteinech čočky u starších lidí, u čoček postižených kataraktou (Horstman 1981), v kolagenu starších lidí (Knecht 1997), v kalmodulinu, v plasmě pacientů se zánětlivým onemocněním, v proteinech z aktivovaných neutrofilů (Fliss 1994).

Antioxidanty můžeme rozdělit podle různých kritérií na hydrofilní a lipofilní, na intracelulární a extracelulární nebo na přirozené a umělé. Podle jejich účinků je rozdělujeme takto:

Tabulka 1 Rozdělení antioxidantů (podle Štípka et al., 2000)

Antioxidanty
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Odstraňující neradikálové hydroperoxidy a peroxid vodíku</i>
Kataláza, Glutathionperoxidáza, Glutathion-S-transferáza (jsou zejména intracelulární)
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Vážící kovy chelátem</i>
Transferin, Haptoglobin, Hemopexin, Ceruloplazmin, Albumin
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Blokující aktivní kyslík</i>
Superoxiddismutáza, Karotenoidy, Vitamin E
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Scavengery zastavující řetězové reakce</i>
Vitamin E, Ubichinol, Karotenoidy, Vitamin C, Kyselina močová, Bilirubin, Albumin
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enzymy opravující a rekonstituující poškozené membrány</i>
Lipáza, proteázy, Enzymy opravující DNA, Transferázy
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Adaptační enzymy</i>

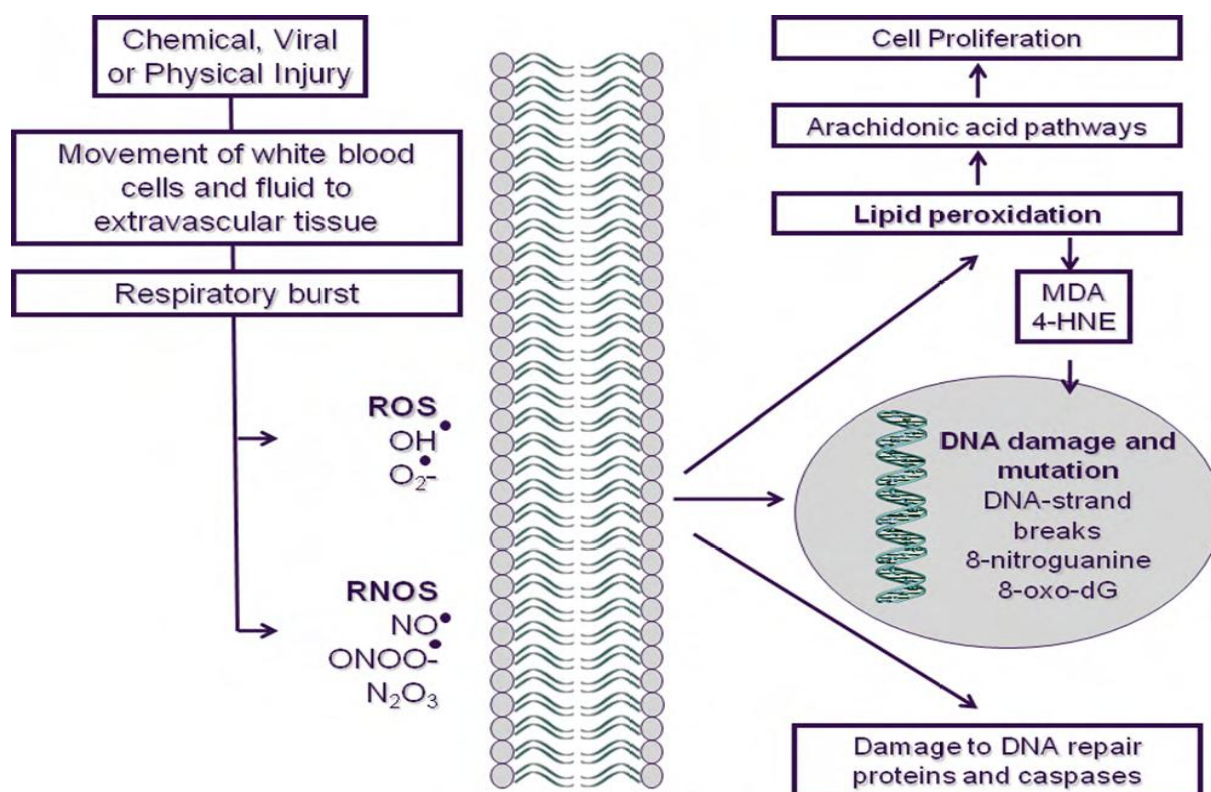
Z léků mají antioxidační účinek např. N-acetylcystein, ze kterého vzniká i glutathion, inhibitory kalciových kanálů, statiny, alopurinol, lokální anestetika, lazaroidy, cimetidin, stobandin, desferoxamin, ebselen.

Zajímavé jsou pro naše sledování hlavně antioxidační efekty lokálních anestetik například lidokainu, který byl prezentován jako možná ochrana hemolýzy erytrocytů vyvolaných 2,2 - azobis (2-amidinopropan) dihydrochloridum (AAPH). Lidokain sloužil spíše jako reaktant než vodíkový dárce při interakci s radikály. Kvantové výpočty ukázaly, že ve srovnání s melatoninem stabilizace N-středu radikálu lidokainu byla vyšší než amid-typu N-středu, ale nižší než indol-typu N-koncentrovaném v melatoninu. Tyto výsledky poskytly základní informace, že lidokain může být antioxidantem (Tang 2009).

Oxidační stres je definován jako relativní převaha volných radikálů nad oxidační obranou. Tato situace může být vyvolána nadměrnou produkcí RNS (reactive nitrogen species), nedostatečnou funkcí antioxidačního systému nebo kombinací obou. Nadměrnou tvorbu ROS (reactive oxygen species) můžeme vidět při některých metabolických situacích, při reoxygenaci tkáně po ischemii, po příjmu oxidoredukčně aktivních xenobiotik nebo uvolněním železa, mědi nebo jiných tranzitních prvků do oxidoredukčně aktivních forem. Stejně tak je škodlivá nadměrná syntéza NO, jehož hladina je udržována ve fyziologických mezích rychlou difuzí do krve a reakcí s oxyhemoglobinem (Holeček et al., 2008).

Oxidační stres je skutečně rizikovým faktorem, který souvisí se zvýšenými hladinami cholesterolu, LDL, HDL ale také s porušenou glukózovou tolerancí. Vznik oxidačního stresu souvisí s onemocněním diabetes mellitus, s kouřením cigaret, s mírnou hyperhomocysteinémií a s arteriální hypertenzí.

Oxidační stres je rovněž popisován v pracech zabývajících se endometriózou a související infertilitou žen, kde však jednoznačná souvislost není prokázána, podle citované studie je oxidační prozánětlivý stav peritoneální tekutiny důležitým prostředníkem endometriózy. Přítomnost zvýšené koncentrace volných radikálů a nízký antioxidační potenciál způsobuje oxidační stres v peritoneálním prostředí a to může být jeden z článků v řetězci událostí, které vyvolávají endometriózu (Augoulea 2009).



Obr.1.Role zánětu a ROS A RNS v poškození tkání (Augoulea 2009)

Popisek obrázku: zánět začíná reakcí, podrážděním toxickou látkou nebo infekcí a je charakterizován přesunem tekutin do tkání extravaskulárně. Následují opravné a regenerační procesy jako je buněčná proliferace, dále jsou uvolněny volné radikály jako ROS a RNS, které aktivují lipoperoxidaci a kaskádu kyseliny arachidonové s produkcí stimulujících eikosanoidů. V této kaskádě jsou také uvolňovány látky, které poškozují DNA, jako je malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxynonenol (HNE). Volné radikály rovněž mohou poškodit nebo modifikovat strukturu a funkci proteinů.

V posledních letech bylo zjištěno, že oxidační stres hraje klíčovou roli v patofyziologii kardiovaskulárních chorob, jako jsou esenciální hypertenze a poruchy rytmu. Bílkoviny jsou hlavní cílem pro oxidanty a to zejména v důsledku jejich hojnosti v biologických systémech. Kinetická data pro řadu radikálů a oxidantů (např. singletového kyslíku a kyseliny chlorné) jsou konzistentní s proteiny. Většina proteinových škod je neopravitelná, ale má škodlivé důsledky pro struktury a funkce proteinů, formace methionin sulfoxidu může být v některých případech obrácena. Hlavní osud oxidovaných proteinů je katabolismus proteasomální a lyzozomální cestou, ale některé materiály jsou pravděpodobně špatně degradovány a hromadí se uvnitř buněk. Hromadění poškozených materiálů může přispět k řadě lidských onemocnění. Zdá se, že zvýšení methioninu hraje klíčovou roli u velkého počtu chorob lidí a zvířat (Davies 2005).

2.2. Bolest

Volné radikály se účastní patofyziologických mechanismů mnoha onemocnění. U plicních onemocnění je zdrojem superoxidu a peroxidu xantinoxidáza a to zejména v počínajících fázích onemocnění. Pro kardiovaskulární onemocnění je oxidační stres rizikovým faktorem a více autorů uvádí na prvním místě endotelovou dysfunkci pro vznik aterosklerózy a hypertenze. Radikálové reakce se také uplatňují u onemocnění gastrointestinálního traktu jako jsou idiopatické střevní záněty, ulcerózní kolitidy, Crohnova nemoc, gastropatie indukované nesteroidními antirevmatiky, kolorektální karcinomy, pankreatitidy a další. Volné radikály se také významně podílejí na patogenetických mechanismech u renálních onemocněních, u diabetes mellitus, u neurodegenerativních onemocnění a onkologických onemocnění. Také stárnutím se zvyšuje tvorba volných radikálů a zhoršuje se schopnost jejich eliminace, což mění vazivovou tkáň, snižuje pružnost vaziva a způsobí vznik vrásek. Volné radikály se podílí na rychlém opotřebovávání buněk, k tomu samozřejmě přispívá špatná výživa a pobyt ve znečištěném prostředí (Holeček 2006).

Při *zánětech* vznikají volné radikály a ROS (reactive oxygen species) látky. Volné radikály vznikají jako reakce na infekci bakteriemi, parazity, kvasinkami, viry a jsou přenášeny do místa zánětu především leukocyty (Holeček 2007). Při zánětu, infekci a sepsi stoupá množství fagocytů, zvláště makrofágů, které obsahují velké množství volných radikálů. Zánět dále vyvolává přímou produkci VR ve fagocytech i v cílových buňkách účinkem $\text{TNF}\alpha$. Je nastartována zánětlivá kaskáda, aktivované makrofágy uvolňují $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-2, IL-6 a IL-8. Nastává deregulace adhesivních receptorů na fagocytech a endotelu. Makrofágy uvolňují volné radikály jako superoxid zejména účinkem NADPH oxidázy, stoupá peroxid vodíku, uvolňují se cytokiny, tvoří se prostaglandiny (PGE_2), leukotrieny (Holeček et al 2008). Také aktivací destiček a uvolňováním kyseliny arachidonové z buněčných membrán vznikají prostaglandiny, vazokonstrikční tromboxan A_2 a zánět podporující leukotrieny. Tyto reakce jsou provázeny tvorbou volných radikálů (Holeček et al 2008).

Volné radikály blokují látky, které brání štěpení bílkovin, uvolňuje se například elastáza, kolagenáza aj. Vznikající radikály zabíjí mikroorganismy, ale poškozují i tkáň. Porušení rovnováhy mezi volnými radikály a antioxidanty ve prospěch volných radikálů již zmíněný oxidační stres způsobí zhoršení imunity (Holeček et al., 2008).

Je známo, že superoxid snižuje protilátkovou odpověď při imunizaci (Koner 1997). Oxidanty usnadňují tvorbu IL-1, IL-8 a $\text{TNF}\alpha$ jako odpověď na zánětlivou reakci. Buňky aktivované imunitní reakcí zvyšují koncentraci interferonu γ (Baier 1996). Glykované bílkoviny, AGE

(advanced glycation end-products) a peptidy aktivují receptory (RAGE) a působí dlouhotrvající zánět. RAGE aktivují tvorbu NF kappa B, potlačují některé endogenní autoregulační funkce, což působí onemocnění jako jsou alergie, Alzheimerova choroba, revmatická artritida, urogenitální poruchy. Lze doporučit vyhnout se potravě obsahující glykací poškozené proteiny a peptidy a podávat antioxidanty, zvláště polyfenoly (Bengmark 2006).

Mezi markery zánětu nejčastěji řadíme aktivaci leukocytů, CRP, iNOS, IL-6, TNF α , mediátoři vaskulárního zánětu jsou ROS z NADPH-oxidázy, myeloperoxidáza, xantinoxidáza, lipoxygenázy (Bonomini 2008).

Vznik volných radikálů u zánětu je nepochybný. Radikály poškozují makromolekuly jako DNA, ale i lipoproteiny, bílkoviny, glycidy, tím i tkáň. Nabízí se možnost snížení zánětlivého poškození antioxidační terapií (Holeček et al., 2008).

Bolest a to především akutní provokuje stresové reakce a nastartuje vznik oxidačního stresu. Oxidační stres vzniká porušením rovnováhy mezi volnými radikály a antioxidanty. Volné radikály mohou poškodit buněčné funkce a to reakcemi jako je lipoperoxidace, oxidace proteinů, destrukce DNA a nitrace albuminu. Opakovaně bylo potvrzeno, že při bolesti se zvyšují volné frakce kyslíku ROS, zejména singletového kyslíku a samozřejmě také volných radikálů hydroxylových a nitroxidových. Existují dvě možná vysvětlení jak se tyto reakce a volné radikály vůbec uplatňují po bolestivé stimulaci. Po intenzivní bolestivé stimulaci následně vzniká zánět se všemi doprovodnými známkami jako je wash out fagocytů a aktivace komplementu (Khan et al., 1994). Protilátky tvoří ve tkáních imunokomplexy, které stimulují produkci volných radikálů a ROS (např. singletového kyslíku a ozónu, Peng et al., 2006). Nekróza buněk může nastartovat vznik superoxidu. Ve studiích českých autorů bylo ukázáno, že zvýšení volných radikálů bylo detekováno v mozkové kůře krysy, ale také v krvi pacientů (Křikava et al., 2004, Rokyta et al., 2003, 2004).

2.3. Bolest a antioxidanty u laboratorních potkanů

Studie, které byly publikovány u laboratorních potkanů se soustředili na studium oxidačního stresu po opakovaných bolestivých stimulacích (Rokyta et al., 2003). Na rozdíl od pacientů byly použity různé antioxidanty a také analgetika jako morfin a hlavně jejich kombinace. Bolestivá stimulace byla opakovaně po dobu pěti dnů provedena s použitím mechanické nocicepce (zasvorkování zadních pacek). Opakovaná stimulace byla použita, protože krátkodobá stimulace byla z hlediska biochemických změn v krvi neefektivní. Bolestivá stimulace zvýšila produkci volných radikálů a zvýšila lipoperoxidaci. Aplikace vitamínové směsi (vitamíny A,C,E,A a Selen) zredukovala lipoperoxidaci (snížily se hladiny TBARS).

Změny MDA a antioxidantů jsou pravděpodobně specifické pro bolestivý mechanismus. Jako důležitý fakt autoři studie uvedli, že je nezbytné podat antioxidační směs těsně před bolestivou stimulací.

Experimentální studie, které byly publikovány u laboratorních potkanů se soustředili na studium oxidačního stresu po opakovaných bolestivých stimulacích (Rokyta et al., 2003, 2004). Na rozdíl od pacientů byly použity různé antioxidanty a také analgetika jako morfin a hlavně jejich kombinace.

Změny MDA a antioxidantů jsou pravděpodobně specifické pro bolestivý mechanismus. Další zajímavou studií (Rokyta et al., 2004) bylo přímé měření volných radikálů v mozku a v krvi po bolestivé stimulaci u krys. Měření byly volné nitroxidové radikály, volné hydroxylové radikály a singletový kyslík. Měření bylo prováděno po aplikaci melatoninu a po bolestivé stimulaci. V mozku byla prokázána snížená přítomnost SOD po bolestivém podnětu, zatímco nitroxidové radikály se zvýšily. Volné hydroxylové radikály nebyly změněny signifikantně. Melatonin snížil hydroxylové a nitroxidové radikály.

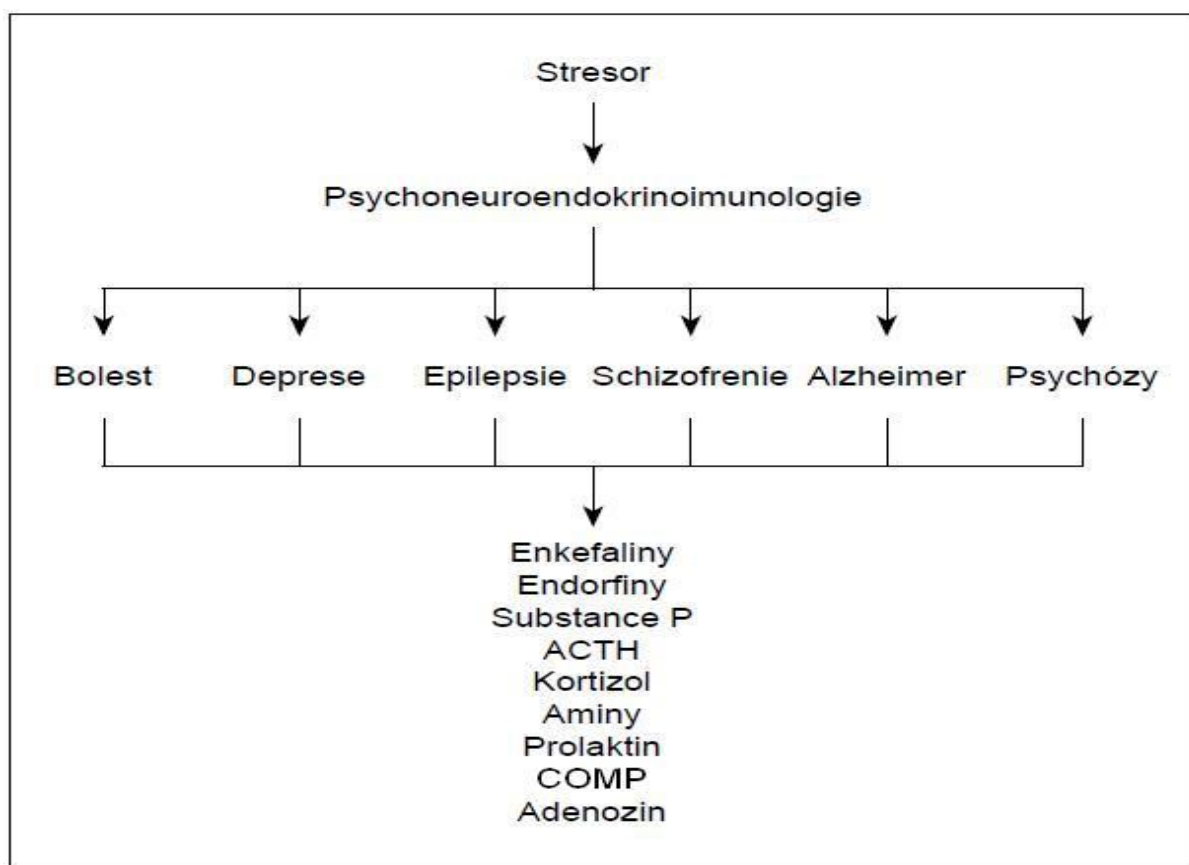
V předchozích pokusech jsme prokázali, zvýšenou tvorbu volných radikálů v mozkové kůře u pokusných potkanů (Rokyta et al., 2004) a také zvýšený počet volných radikálů v krvi lidských pacientů (Kirk & White 2006; Křikava et al., 2004; Karbownik-Lewinska et al, 2007).

Zánětlivé změny se vyvíjejí postupně a pomalu je to dáno zejména pohybem fagocytů do místa zánětu a teprve následnou produkcí singletového kyslíku. Během chronické bolesti, kde probíhají chronické zánětlivé změny je singletový kyslík rovněž zvýšen (Escobar et al., 1996). ROS a volné frakce kyslíku se podílejí a také doprovázejí různé typy chronické bolesti, nejvíce je podíl ROS přisuzován neuropatické bolesti. Tyto volné frakce kyslíku ROS jsou vysoce toxické a jsou zodpovědné i za různá neurodegenerativní onemocnění. Na zvýšení mitochondriálních volných frakcí ROS se podílí mechanismus centrální senzitivace u neuropatické bolesti u krys (Park et al., 2006).

2.4. Bolest a stres

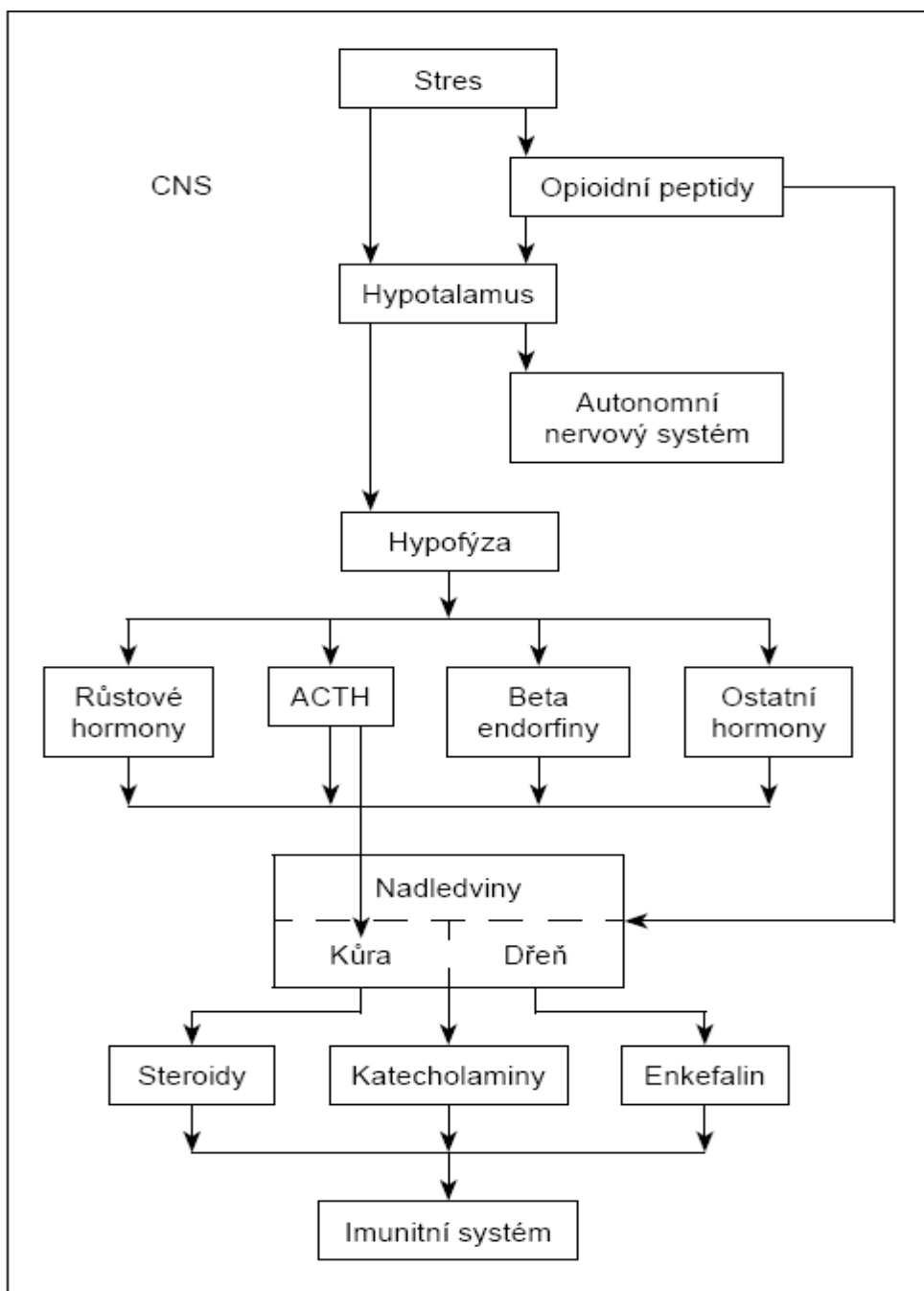
Bolest a stres mají vliv i na synaptickou aktivitu, morfologii dendritů a způsobují neurotoxická poškození u pacientů.

Na stresu i bolesti se účastní všechny řídicí systémy organismu, fylogeneticky nejstarší imunologický, mladší endokrinní a nejmladší nervový s jeho nadstavbou psychickou.



Obr.2.Vliv stresoru na psychoneuroendokrinoimunologicky podmíněná onemocnění (podle Rokyta et al., 2006)

Stresor vyvolává různé psychoneuroendokrinoimunologické reakce, z nichž rezultuje několik typů onemocnění, mezi nimi i bolest. Tyto změny, které se projevují zejména ve změnách hladiny různých látek, jako jsou enkefally, endorfiny, substance P, ACTH, kortizol, aminy, prolaktin, COMP, adenzin, ATP. Tento fakt nás opravňuje uvažovat o souvislostech mezi těmito onemocněními. Víme, že některá z nich mají zvláště blízký vztah (Rokyta 2006). Například bolest a deprese se vyznačují tím, že mají některé společné receptory, především NK1 receptory (neurokininové receptory 1).



Obr. 3. Schéma zapojení řídicích systémů v regulaci bolesti (Rokyta 2006)

2.5. Akutní pooperační bolest je organismem vnímána jako silný podnět, který vyvolá a nastartuje reakce organismu jako je nocicepce, senzitivace (periferní nebo centrální) a neurohumorální modulace. Ve studiích, kde byly sledovány biochemické parametry během bolesti se autoři soustředili na sledování změn parametrů v lipidovém, proteinovém a sacharidovém spektru během bolesti. V jedné z prací měřili autoři celkový cholesterol, HDL a LDL cholesterol, triglyceridy, celkové bílkoviny, albumin, C-reaktivní protein (CRP),

apolipoprotein B, alfa lipoprotein, beta-lipoprotein, pre-beta lipoprotein a glukózu (Křikava et al., 2004). Studie se zúčastnilo 15 mužů s diagnózou akutní cholecystitidy. Kromě těchto parametrů byla pravidelně sledována a hodnocena intenzita bolesti pomocí VAS- Vizuální analogová škála (0-10). Časování odběrů krve bylo následující: při přijetí pacienta, za týden a za měsíc po operaci. Autoři popsali signifikantní snížení intenzity bolesti. Studie, která byla provedena u pacientů s frakturami kostí a během akutní pankreatitidy sledovala stejné parametry cholesterol, HDL a LDL cholesterol, triglyceridy, celkové bílkoviny, albumin, C-reaktivní protein (CRP), apolipoprotein B, alfa lipoprotein, beta-lipoprotein, pre-beta lipoprotein a glukózu (Křikava et al, 2004). Byla zde použita jiná metodika a pacienti byli rozděleni do tří skupin po deseti: bez bolesti, s diagnózou akutní pankreatitidy a s frakturami končetin. Nejsignifikantnější změny byly popsány v lipidovém spektru zejména u LDL a HDL cholesterolu. Změny u LDL cholesterolu byly popsány u obou skupin nemocných pacientů, hodnoty byly signifikantně vyšší než kontroly u pacientů zdravých. Hladiny HDL cholesterolu byly signifikantně vyšší hlavně u skupiny pacientů s akutní pankreatitidou ve srovnání se zdravými pacienty a s pacienty s frakturami. Hladiny zvýšeného LDL se vrátily po 30 dnech od vzniku bolesti jak u skupiny pankreatitid, tak u skupin pacientů s frakturami. V kontrolní skupině zdravých pacientů se hladiny LDL neměnily a nevybočily z normálních mezí. Hladiny triglyceridů a alfa-lipoproteinů rovněž klesaly u skupin pacientů s pankreatitidami a frakturami a po měsíci se opět vrátily k normálu. U hladin glukózy byly signifikantně vysoké hladiny u pacientů s pankreatitidou. U hladin apolipoproteinu B, CRP, beta-lipoproteinů a pre-betalipoproteinů nebyly potvrzeny signifikantní změny hladin během akutní bolesti. Vstupní hodnota VAS byla vyšší u pankreatitid než u fraktur.

Z obou výše zmíněných studií vyplývá, že biochemické změny v krvi během akutní a chronické bolesti jsou měřitelné. Otázkou zůstává, zda bude někdy možné tyto biochemické koreláty považovat za běžné markery akutní a chronické bolesti.

Vzhledem k tomu, že markantnější změny byly potvrzeny u akutní intenzivní bolesti u fraktur a pankreatitid tak, jsme si vybrali k dalšímu studiu oxidačního stresu akutní pooperační bolest.

2.6. Opioidní analgezie (Morfin a Pethidin)

Opioidní analgézie je vysoce efektivní pro léčení mnoha forem akutních a chronických bolestí. V opioidní toleranci je zavzata aktivace N-methyl-d-aspartátových receptorů a proteinkinázy stejně jako regulace transportérů glutamátu, který opioidy tlumí. Důležitý je vztah mezi nervovou plasticitou a mechanismem opioidní tolerance. V posledních studiích se ukazuje, že nervová plasticita je spojena s vývojem opioidní tolerance a může aktivovat pronociceptivní mechanismus, v jehož rámci centrální nervový systém může vytvářet

analgetický efekt opioidů.

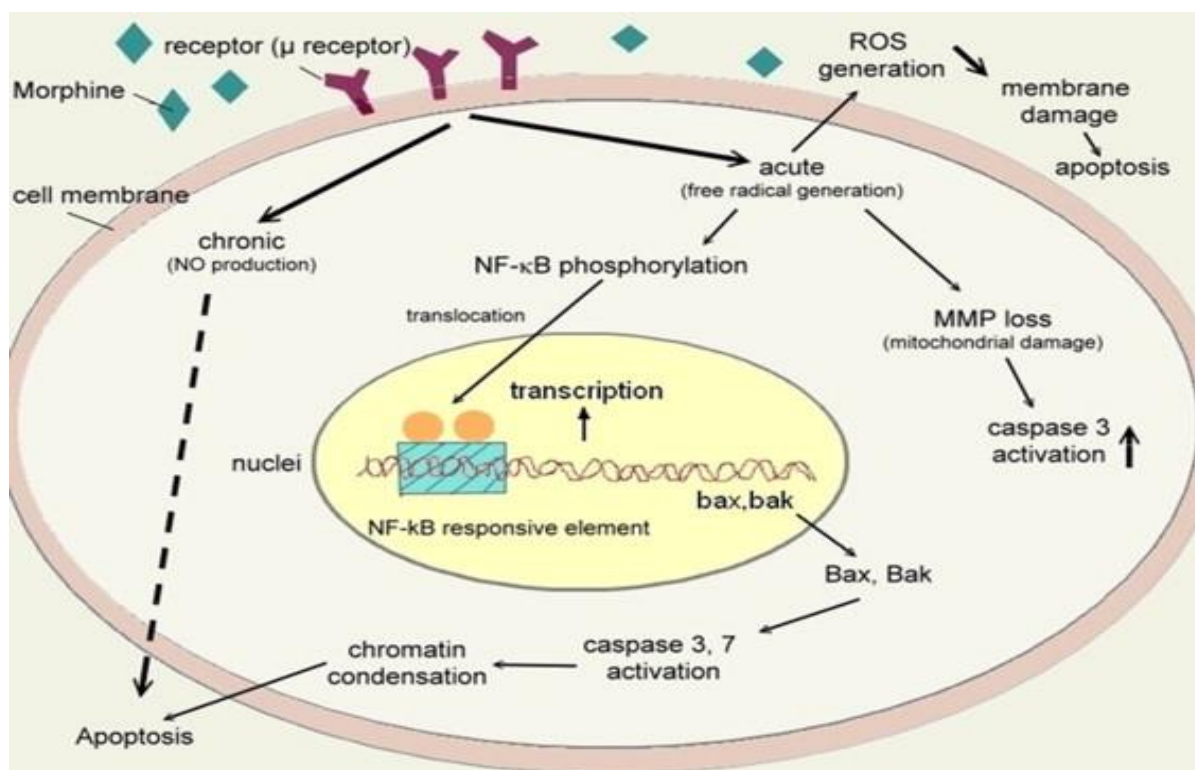
Silné opioidy jsou úplnými agonisty na μ -receptorech a jsou vyhrazeny pro silné, neztížitelné bolesti, které nelze dostatečně zmírnit neopioidními analgetiky nebo slabými opioidy. V naší studii jsme ze silných opioidů použili Morfin a Pethidin.

Morfin – Biologická dostupnost je po podání per os v rozsahu 20–40 % dávky. Morphin se vyznačuje „first-pass efektem“, při průchodu játry po vstřebání z trávicího ústrojí se z větší části metabolizuje. Hlavními metabolity jsou morfin-3-glukuronid (M3G), který nemá analgetický účinek a morfin-6-glukuronid (M6G), má silnější analgetický účinek než samotný morfin, oba metabolity se tvoří u člověka v poměru 5:1 ve prospěch 3-glukuronidu. M3G se vylučuje žlučí do střev, kde se částečně hydrolyzuje. Uvolněný morfin se poté znovu vstřebává. Malá část morfinu je metabolizována na normorfin (17-demethylmorfin) a jeho glukuronidy (Lullmann 2002).

U novorozenců je schopnost konjugace s glukuronou kyselinou omezena, proto se u nich morfin vylučuje z organismu pomaleji než u dospělých. Morfin i jeho metabolity se vylučují ledvinami. Biologický poločas (doba snížení koncentrace v krevní plazmě na polovinu) je 2–4 hodiny. M6G je více rozpustný ve vodě (hydrofilní), což umožňuje rychlejší vyloučení z organismu, snadno proniká i hematoencefalickou bariérou do mozku, kde působí. Vysvětluje se to tím, že při určité konformaci molekuly jsou hydrofilní skupiny zakryty. To zřejmě umožňuje průnik hematoencefalickou bariérou, kterou mohou snadno projít jen lipofilní látky (Lullmann 2002). Morfin je zlatým standardem v léčbě silné bolesti. Výhodou morfinu je dostatečně silný a dlouhý analgetický efekt, nízká cena, široká dostupnost aplikačních cest, velká stabilita a řada studií z různých pohledů. Morfin je lékem volby ve většině případů, kdy se uvažuje o volbě silných opioidů.

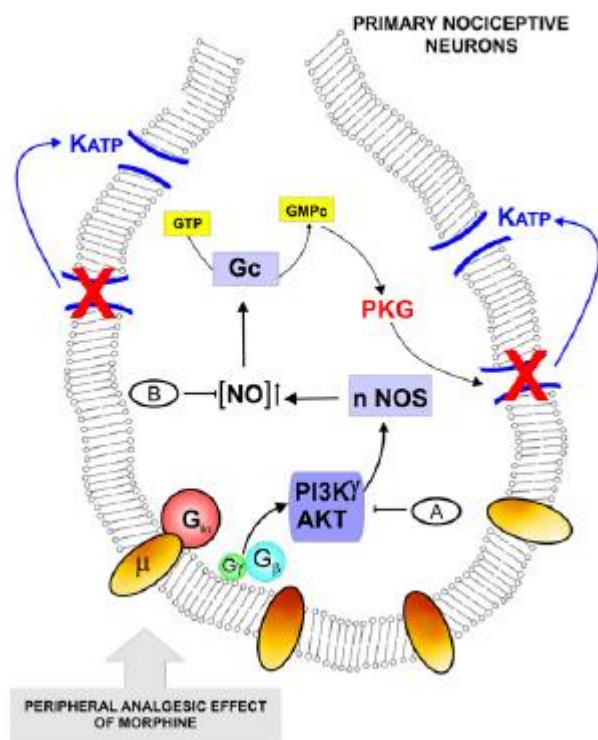
Morfin a ROS: Jedna studie zkoumala, zda intracelulární ROS byl zvýšen po léčbě morfinem, vyšetřována byla z kultivace lidské pupečnickové žíly endoteliálních buňkách. Pomocí naloxonu analyzovali záchranný efekt, který ukázal, že endoteliální buňky v kulturách lidských umbilikálních žíl (přeléčení buď nízkou (102 nM) nebo vysokou (104 nM) dávkou naloxonu mohl zvrátit morfin-zprostředkovanou ROS produkci.

Výsledky ukázaly, že kaspázy 3 a 7 byly zapojeny do morfin-indukované apoptózy v kulturách lidských umbilikálních žíl endotelových buněk a že opioidní receptory jsou důležité v morfin-zprostředkované produkci kaspáz (Hsiao et al. 2009).



Obr. 4: Schéma podle Hsiao et al. (2009) ukazující dráhy které zprostředkují morfinem indukovanou apoptózu v buňkách lidské pupečníkové krve. Morfin je schopen indukovat apoptózu buněk pupečníkové krve.

Antihypersenzitivní aktivita morfinu u animálních modelů neuropatické bolesti je kompletně závislá na aktivaci A 1 adenosinových receptorů. Virový vektor μ opioidních receptorů, který je spojen s adenosinovým virálním vektorem při aplikaci do sedacího nervu, vyvolává velkou upregulaci μ opioidních receptorů v zadních kořenech míšních po dobu 6 měsíců. Zvyšuje 5 x antinocicepční potenciál intratekálního morfinu. Jednoduchá intratekální injekce morfinu u krysa má bifazickou odpověď. Intratekální morfin v dávce 0,1 – 10 μ g vyvolává dávkově dependentní antinocicepční efekt potlačitelný naloxonem. Intratekální podání morfinu s interleukinem 1 receptorovým antagonistou (IL1 RA) zvyšuje akutní morfinovou analgezii, což blokuje hyperalgezii, alodynii a analgetickou toleranci. Fraktalkin má podobný efekt tím, že aktivuje IL 1 a ten může modulovat efekt intratekálního morfinu. Intratekální morfin nemusí mít jenom analgetický účinek, ale také centrální antispastický účinek. Podání morfinu v dávce 1 – 10 mg u chronické nenádorové bolesti bylo úspěšné u 68,4 % pacientů. Spokojenost pacientů byla 90 %. U 50 % z nich se snížilo VAS. Intratekální aplikace morfinu byla lepší u pacientů s nocicepční bolestí než s bolestí neuropatickou, nebo s deafferentačními bolestivými syndromy. U pacientů s refrakterní nádorovou bolestí intratekální aplikace morfia snížila bolest z 86 na 18 % (Vrba a Rokyta 2007).



Obr. 5: Schematické znázornění molekulární podstaty periferní analgezie morfinu (Cunha 2010).

Popisek obrázku: Aktivace opioidních receptorů v primárním nocicepční neuronech začíná tím, že morfin spustí aktivaci dráhy PI3K γ /AKT a následně způsobí stimulaci nNOS a zvýšení NO produkce. NO nepřímo prostřednictvím stimulace cGMP / PKG nastartuje up-regulaci proudů KATP a podporuje hyperpolarizaci primárních nociceptivních neuronů (Cunha 2010).

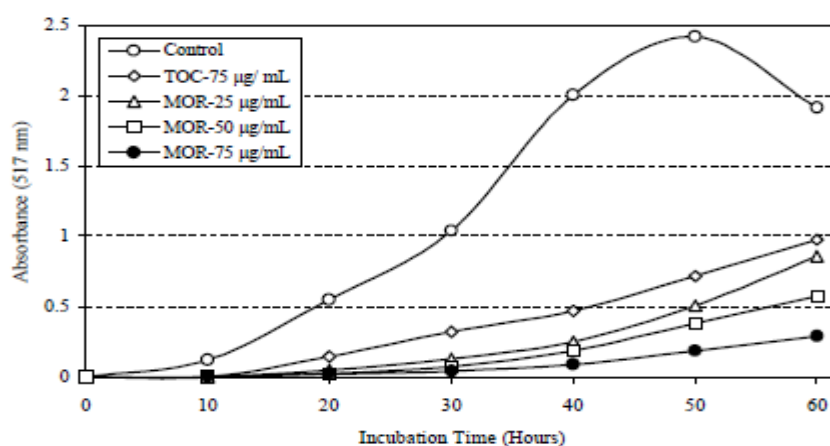
Na základě poznatků, že CAMP jako intracelulární druhý posel podílel se na PGE2-indukované nociceptorové senzitivizaci a že opioidní receptor při aktivaci in vitro byl přepojen na inhibici adenylyl cyclazy a bylo původně předpokládáno, že léky vyvolávají zánětlivou hypernocicepci přímo inhibicí PGE2-indukované adenylylcyclázové aktivity (Collier 1974).

Následné in vitro studie potvrdily schopnost opioidů inhibovat aktivitu adenylyl-cyclazy v míšních gangliích (DRG) neuronů umocněné za předpokladu, že periferní aktivita morfinu byla způsobena inhibicí adenylylcyclázové aktivity.

Výsledky z výše zmíněné studie ukazují, že aktivace PI3K γ /AKT signálních dráh je hlavní schopností morfinu přímo blokovat zánětlivou hypernocicepci. Morfin působí přímo na hlavní nocicepční neurony PI3K γ /AKT, které aktivují a následně i stimulují nNOS / NE / KATP kanály antinociceptivní dráhy. V dalším případě hyperpolarizace nociceptivních neuronů

působí proti jejich zvýšené dráždivosti během zánětlivého procesu. Ve schematickém znázornění současné hypotézy, také naznačují možný mechanismus NO modulační KATP proudy nepřímo přes aktivaci cGMP / PKG signalizaci. Vývoj léků, které napodobují působení morfinu na této cestě mohou představovat strategii pro léčbu neuropatických bolestí. Morfinová periferní analgezie byla objevena jako přímý vliv na již probíhající zánětlivou hypernocicepci vyvolanou prostaglandinem E2 (PGE2) podaným injekčně do tlapky potkana. Proto na rozdíl od aspirinu a podobných léků, jejichž analgetický mechanismus závisí na prevenci nociceptorové senzitivizace inhibující syntézu prostaglandinů, opioidy mají schopnost blokovat přímo nociceptorovou senzitivizaci (Cunha 2010).

Celkovou antioxidační aktivitu morfinu je možné stanovit pomocí thiokyanatanu (Gulcin 2004). Morfin byl vystaven účinné a silné antioxidační aktivitě a ve všech koncentracích.



Obr. 6: Antioxidační efekt Morfinu in vitro

Tato studie jasně ukazuje, že morfin má silný antioxidační efekt in vitro oproti různým antioxidantům.

Z výše uvedených testů vyplývá, že možný mechanismus antioxidační aktivity morfinu je redukční schopnost, vazebná schopnost železa, schopnost uvolnit vodík a zneškodnit peroxidu vodíku, superoxid a volné radikály (Gulcin 2004).

Pethidin/meperidin – Pethidin je syntetická látka s velmi silným analgetickým účinkem. Působí hlavně na CNS, vyvolává euforii, útlum dýchání, stimuluje spouštěcí zónu pro nevolnost a zvracení, zvyšuje uvolňování antidiuretického hormonu, snižuje vylučování adrenokortikotropního hormonu a gonadotropních hormonů, zvyšuje hladinu krevního cukru. Na hladké svalstvo trávicího traktu působí nejednotně, spazmogenně i spasmolyticky. Zpomaluje vyprazdňování žaludku, vyvolává slabší spasmus žlučových cest a méně výrazné

zvýšení tlaku v žlučových cestách než morfin, může způsobovat mírnou zácpu. Nitrosvalové podání neovlivňuje významně frekvenci srdce, ale nitrožilní podání ji často zvyšuje. Po nitrožilním podání v průběhu anestezie klesá srdeční výdej a stoupá centrální venózní tlak. Pethidin v analgetických dávkách tlumí dýchací centrum a snižuje jeho citlivost na CO₂. Snižuje především dechový objem, dechová frekvence není výrazně ovlivněna. Způsobuje uvolnění histaminu a zvyšuje tak možnost bronchokonstrikce. Ve srovnání s morfinem má nižší spazmogenní efekt často bývá indikován akutní kolikovitě bolesti. Pethidin má kratší trvání účinku (2 h) a navíc není vhodný pro dlouhodobou léčbu, protože se při ní může hromadit toxický metabolit norpethidin způsobující třes, myoklonus, neklid až křeče. Je také závažná interakce pethidinu s inhibitory monoaminoxidázy, kdy se mohou objevit až nebezpečné poruchy CNS (koma nebo excitace), výrazné změny krevního tlaku a činnosti srdce a hyperpyrexie. Nevhodnost pro dlouhodobou léčbu chronické bolesti vyplývá i z psychotropního efektu a zvýšeného rizika vzniku psychické závislosti. Pethidin se však ukázal jako jeden z nejúčinnějších léčebných prostředků k zabránění pooperačního třesu (Terasako 2000). Zatím není přesně popsán mechanismus snížení pooperačního třesu, ale studie ukázaly, že použití naloxonu s pethidinem může působit prostřednictvím κ receptoru spíše než přes μ opioidní receptor. Fungování Pethidinu proti třesu bylo inhibováno vysokou dávkou naloxonu, který blokuje oba μ i κ receptory, ale musí být odpovídající dávka, protože naloxon v nízké dávce blokuje pouze μ receptory. (Ibqal 2009). Samozřejmě, že hlavní nežádoucí účinky pethidinu jako nevolnost a zvracení zůstávají hlavním problémem a je tedy nutné z anamnézy zjistit zda pacient není na Pethidin přecitlivělý.

2.7. Herniotomie

Operace tříselné kýly –herniotomie patří mezi nejčastěji prováděné operace s počtem 800.000 za rok ve Spojených státech amerických (Rutkow 2003). Až u 10% pacientů má za následek chronické bolesti, které ovlivňují každodenní činnost pacienta.

Tříselná herniotomie je ideální modelem pro zkoumání patogenních mechanismů podílejících se na chronické pooperační bolesti, protože pacient jsou obvykle jsou zdraví, kromě diagnózy tříselné kýly. Kombinace nervového poškození a probíhajícího zánětu může zvýšit pohotovost z nociceptorů v dorzálních míšních gangliích, a tím usnadnit rozvoj hyperalgesie a bolesti (Song 2003). Přítomnost wind-up fenoménu je odrazem centrální senzitivace, která s největší pravděpodobností je generována z periferie, protože periferní zánět a hypersenzitivita nociceptorů inervujících hluboké kožní struktury jsou příčinou kožní hyperalgesie a alodynie. Podobně jako nervová léze, může i operace způsobit přepnutí fenotypu na nízkoprahová

vlákna A β vlákna a reagovat na vstup bolestivých impulzů do centrálního nervového systému a způsobit tak bolest a centrální senzitivizaci (Bove 2003). Další podporou hypotézy o periferní senzitivizaci jako o primárním generátoru bolesti je skutečnost, že mechanická hyperalgie vznikající po zánětu je zprostředkován díky citlivosti periferních nociceptorů spíše než primární centrální senzitivizací (Andrew 1999).

Ať už je generátorem chronické bolesti periferní nebo centrální senzitivizace, ze souvisejících patofyziologických mechanismů odpovědných za chronickou bolest po herniotomii pravděpodobně stojí intraoperační poškození nervů nebo zánětlivá reakce s rozvíjející se sekundární nervovou dysfunkcí. Kožní řez může poškodit kožní a podkožní struktury a fixace sítě může poškodit nervy procházející operační pole zejména (nervy ilioinguinální, iliohypogastrický a genitofemorální). Kromě toho, pooperační zánět nebo síťka mohou přispívat k mechanické bolesti, která je na pohybu přímo závislá (Aasvang 2005). Bolest se může vyvinout a být udržována v důsledku zánětu v okolí nervových vláken, při neporušeném axonálním těle (Bove 2003).

3.Hypotézy

1. Jak působí akutní bolest na organismus a je možné tyto změny změřit a popsat?
2. Je možná objektivní evaluace akutní bolesti použitím různých biochemických parametrů a zejména volných radikálů?
3. Kterým typem analgetik dosáhneme kvalitní preemptivní a následně pooperační analgésie?
4. Zda kromě nalezení optimální preemptivní a pooperační analgésie lze rovněž objasnit společné mechanismy pooperační bolesti a oxidačního stresu.

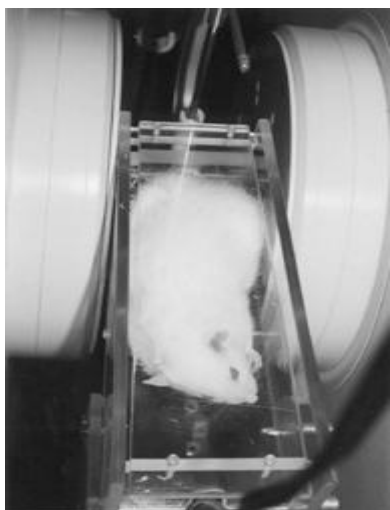
4. Materiál a metodiky

4.1. Experimentální část studie –laboratorní potkani

Všechny pokusy provedené na laboratorních potkanech byly schváleny Komisí pro ochranu pokusných zvířat 3. Lékařské fakulty UK v Praze, které jsou v souladu s předpisy IASP (Mezinárodní asociace pro studium bolesti, Zimmermann 1983), pokyny NIH (Národního ústavu zdraví) USA pro péči a používání laboratorních zvířat a Direktivou Rady Evropské Unie z 24.11.1986 (86/609/EEC). Pro experimenty jsme použili 31 dospělých samců potkanů (kmene Wistar). Zvířata o váze 250-300 gramů byla chována v plastových akváriích s měkkou podestýlkou. Měla volný přístup k potravě a vodě a byla ustájena v režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

Použili jsme dva typy animálních modelů pro opakovanou akutní bolest mechanickou stimulací, při níž zvířata byla stimulována 10 minut 5 po sobě jdoucích dnů pomocí svorek umístěných na obou zadních končetinách. Během měření EPR byli potkani v celkové anestézii s použitím směsí Ketaminu a Xylazinu a byly měřeny hydroxylové a nitroxidové volné radikály a singletový kyslík.

Cílem studie bylo prokázat, že jsou možná přímá měření hydroxylových radikálů a singletového kyslíku v ocasu živých laboratorních potkanů. Rovněž jsme se snažili prokázat účinky antioxidantů, které byly měřeny v ocase potkanů. Druhým zmíněným animálním modelem akutní pooperační bolesti u laboratorních potkanů byla laparotomie. Po sutuře a dokončení laparotomie se zvířata začala budit během 30-60 minut. Následně byli potkani ponecháni v klidu po dobu 2-3 hodin a před měřením EPR jim byla podána anestézie a byl sledován účinek antioxidantů na hydroxylové radikály a singletový kyslík v krvi v ocase potkanů. Laparotomie byla provedena v celkové anestézii, opět s použitím kombinace Xylazinu a Ketaminu. Antioxidační směs: vitamin A (β karoten) 0,5 mg / kg, vitamin C 3,5 mg / kg, vitamin E (Trolox α - tokoferol ve vodě rozpustný vit. E) 5 mg / kg a Selen ve formě $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,25 μg / kg byla podáván intramuskulárně před laparotomií. Všechna měření EPR byla provedena v ocasu znecitlivěných zvířat.



Obr. 7: Umístění laboratorního potkana v přístroji EPR

4.2. Klinická část studie – pacienti

Studii tvořili pacienti s diagnózou hernia inguinalis, u kterých bylo možné po operaci očekávat bolest s intenzitou větší než 5 měřenou pomocí VAS (Vizuální analogová škála). Celkem bylo do studie zařazeno 67 pacientů (55 mužů a 12 žen) hospitalizovaných na chirurgické klinice. Modelovým chirurgickým výkonem akutní pooperační bolesti byla herniotomie tříselné kýly. Pacienti byli náhodně rozděleni do tří skupin dle podávané preemptivní analgezie (Pethidin $n=26$, Morfin $n=16$, bez premedikace $n=25$). Pethidin byl podáván v dávce 0,5-0,7 mg/kg intramuskulárně a 1% Morphin v dávce 0,1-0,2 mg/kg intramuskulárně čtyřicet minut před výkonem. Tyto typy analgézie byly cíleně vybrány, protože jsou nejčastěji indikovány pacientům před chirurgickými výkony. Pro hodnocení intenzity bolesti a její objektivizaci jsme použili metody subjektivní a objektivní:

1. subjektivní hodnocení bolesti: VAS- vizuální analogová škála

2. objektivní hodnocení bolesti:

- a) měření změn spekter lipidů, sacharidů a proteinů
- b) měření změn metabolitů volných radikálů (NADPH oxidáza, SOD, GPX, Thioredoxin)
- c) měření volných radikálů přímou metodou EPR (elektronová paramagnetická rezonance)

Krev pacientů jsme odebírali v následujícím časovém schématu, které jsme postupně testovali:

- 1. před premedikací a výkonem
- 2. 4 hodiny po výkonu
- 3. 24 hodin po výkonu

4.3. Přímé měření volných radikálů-EPR Metodika

Elektronová paramagnetická (spinová) rezonanční spektroskopie využívá interakce magnetického pole a mikrovlnné energie k identifikaci a stanovení volných radikálů, paramagnetických komplexů a excitovaných stavů. Volný radikál je částice s jedním případně i více nepárovými elektrony a zpravidla je velmi reaktivní. Pro studium krátkodobě žijících radikálů (nanosekundy) se využívá metoda spinového zachytu. Využívají se chemikálie (spin trap), které s volným radikálem vytvoří addukt s delší dobou životnosti. V medicíně se obvykle studují hydroxylové ($\cdot\text{OH}$), superoxidové ($\text{O}_2\cdot^-$), nitroxidové ($\cdot\text{NO}$) a peroxyradikály ($\text{ROO}\cdot$). Jedná se o nedestruktivní metodu. Je potřeba cca 300 μl vzorku krve. Biologické vzorky nejsou stabilní a uchovávají se v kapalném dusíku. Jako spin trap se využívá DMPO (5,5-Dimethylpyrrolin N-oxid) a PBN (Phenyl-Tert-Butylnitrone). Měřením získáme charakteristická spektra, která přísluší jednotlivým studovaným radikálům a tím se provede identifikace a stanovení koncentrace radikálu. V našich měřeních jsme stanovovali hydroxylové a nitroxidové radikály a také singletový kyslík

Vlastní postup měření a vyhodnocování vzorků

K odebraným vzorkům byl ihned přidán spinový lapač (spin trap) DMPO (5,5-Dimethylpyrrolin N-oxid, Sigma-Aldrich) nebo PBN (Phenyl-Tert-Butylnitrone) a vzorky byly zamrazeny v kapalném dusíku a transportovány. Před EPR měřením byly vzorky rozmrazeny a v kapalném stavu převedeny do křemenné ploché kyvety (tloušťka vrstva 0.5 mm) a provedeno EPR měření při teplotě 25 °C.

Získaná spektra byla vyhodnocována pomocí programu Bruker-Biospin a zobrazena pro další potřeby pomocí grafického programu Origin. Program Bruker-Biospin umožnil přímé odečítání spektrálních konstant (g-faktor, šířka signálů (ΔH_{pp} , v jednotkách magnetického pole (Gauss, případně militesla), umístění signálů v magnetickém poli a intenzitu signálů (A_{pp} , v pracovních jednotkách EPR). Signály byly srovnávány se spektry standardů ($\text{Mn}^{2+}/\text{ZnS}$, $\text{Cr}^{3+}/\text{MgO}$, Magnostech, Berlin, Německo). Kvantitativní údaje byly získávány užitím dvojí integrace, pomocí počítače, příp. pomocí spektrálních parametrů (ΔH_{pp} , A_{pp}) Byl použit vzorec: $N_x = N_{\text{stand.}} \times (\Delta H_{pp2} \times A_{pp})$ vzorek: $(\Delta H_{pp2} \times A_{pp})$ standard N_x = vypočítávaný počet spinů, $N_{\text{stand.}}$ = počet spinů ve standardu, $(\Delta H_{pp2} \times A_{pp})$ vzorek = člen, zahrnující spektrální parametry vzorku, $(\Delta H_{pp2} \times A_{pp})$ standard = člen, zahrnující spektrální parametry standardu.

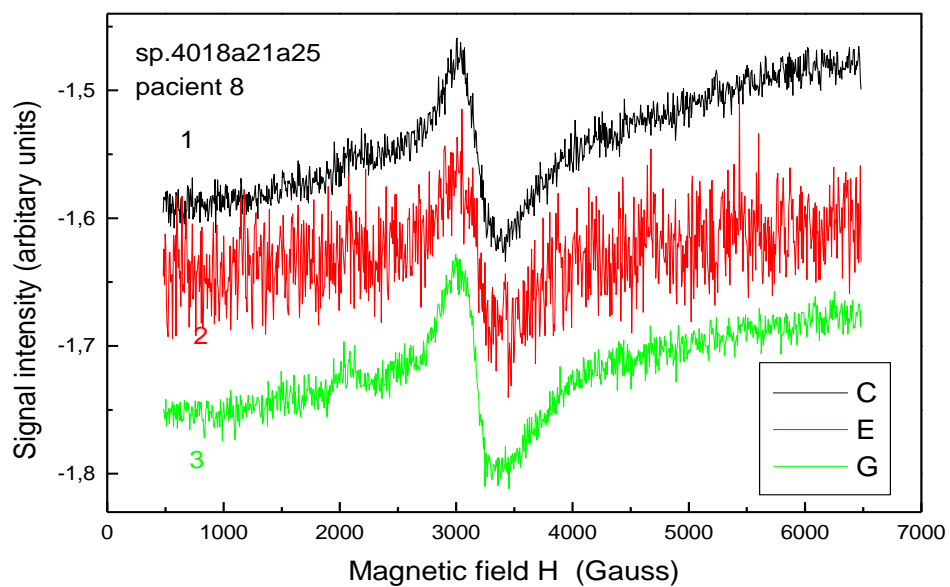
Singletový kyslík byl studován po aplikaci 2,2,6,6-Tetramethyl Piperidin (TMP), který je specifický pro určování singletového kyslíku- $^1\text{O}_2$ – Ten selektivně reaguje tvorbou reálně stabilních nitroxidových radikálů. Tripletové spektrum odpovídá kvantitě singletového

kyslíku.

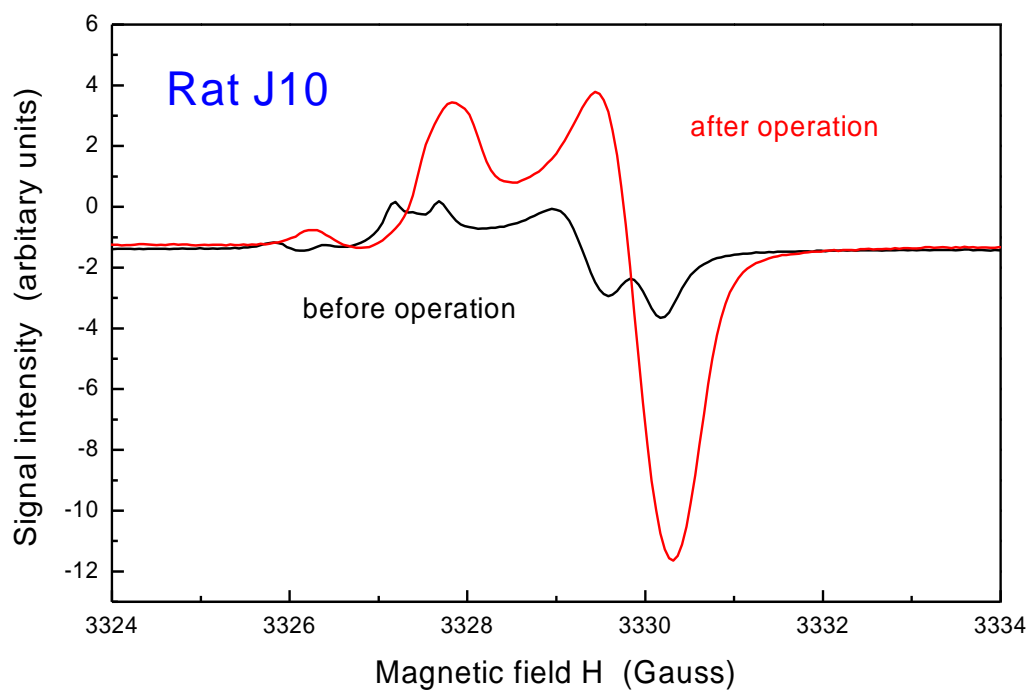
Uvedené reakce byly studovány na krysách kmene Wistar. Měření bylo prováděno před a po bolestivé stimulaci za různých podmínek. Před EPR měřením byla injekčně do svalu podána dávka spinového lapače (spin trap). Bylo provedeno měření EPR před bolestivou stimulací a také ihned po probuzení krysy z celkové anestézie. Celkové znecitlivění krys bylo provedeno Ketaminem (5% ketamin 90 mg/kg) a Xylazinem (2 % xylazin 15 mg/kg) dávce a následně byla provedena laparotomie. Poté byla krysa umístěna na plastový stolek v blízkosti resonátoru EPR a její ocas byl vsunut zčásti do resonátoru, ve kterém již byla křemenná trubka a proběhlo měření EPR spekter.



Obr.8. Přístroj Bruker-Biospin pro měření EPR



Obr.9. EPR spektrum hydroxylových radikálů pacienta, široký signál měřený ve vzorcích ze tří odběrů krve



Obr.10. EPR spektrum hydroxylových radikálů v ocase laboratorního potkana, před a po laparotomii

4.4. Biochemické metody

Superoxiddismutáza je jeden z nejvýznamnějších enzymů v metabolismu reaktivních forem kyslíku (ROS). Katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku. Při mírném oxidačním stresu může její aktivita růst (kompenzatorně se zvyšuje její syntéza), tento enzym však může být snadno poškozen a při výraznějším stresu tak jeho aktivita naopak klesá.

Aktivita superoxiddismutasy (SOD) se měří spektrofotometricky. Reakční směs obsahuje xanthinoxidasu, která v přítomnosti xanthinu slouží jako zdroj superoxidu ($O_2^{\cdot-}$). Superoxid redukuje tetrazoliovou modř (NBT) za vzniku barevného formazanu. Superoxiddismutasa ze vzorku vychytává superoxid a rozkládá jej, a tím inhibuje vznik formazanu. Metoda měří aktivitu celkové superoxiddismutasy ve vzorku (tj. všech izoenzymů), v našem případě v plné krvi. Není srovnatelná s imunochemickými technikami, které stanovují i částečně poškozené molekuly SOD a nevypovídají tak o skutečné scavengerové aktivitě SOD.

Glutathionperoxidáza se donedávna považovala za nejvýznamnější scavenger peroxidu vodíku ve většině tkání (dnes se tato úloha přičítá peroxiredoxinům), nepochybně se však podílí na odstraňování této látky, pokud její koncentrace dosáhne patologicky vysokých hodnot. Při oxidačním stresu se aktivita GPx kompenzatorně zvyšuje, větší stres však poškozuje enzym a snižuje jeho aktivitu.

Technika měření aktivity GPx je založena na spřaženém systému enzymatických reakcí. Organický peroxid (tert-butyldhydroperoxid, tBHP) oxiduje v přítomnosti GPx1 glutathion. Oxidovaný glutathion se následně regeneruje pomocí glutathionreduktázy (GSR) proti NADPH. Spektrofotometricky se měří kinetika poklesu koncentrace NADPH v reakční směsi. Metoda je citlivá především na izoenzym GPx1. Měříme v plné krvi.

NADPH oxidáza (či přesněji NAD(P)H oxidasy – soubor několika enzymů) se dnes považuje za jeden z nejvýznamnějších producentů reaktivních forem kyslíku (ROS) v cévní stěně.

Podílí se jak na regulaci některých fyziologických funkcí cév (např. regulaci krevního tlaku, permeabilitu, angioneogenezi), tak i na rozvoji několika onemocnění (hypertenze, aterosklerózy, hypertrofii medie při kardiovaskulárních onemocněních, angioneogenezi u nádorů atd.). Stanovení aktivity NOX v cévní stěně je u lidí obtížné (vyžaduje odběr a okamžité zpracování vzorku cévy), ukazuje se však, že tuto aktivitu odráží i aktivita NOX v granulocytech – přestože jde o jiný izoenzym, který slouží jiným účelům (produkuje mikrobicidní koncentrace ROS v rámci imunitní odpovědi, při respiračním vzplanutí fágů). Je pravděpodobné, že část signální dráhy, která reguluje NOX v cévní stěně je společná s regulací fagocytární NOX, nebo že zvyšuje aktivitu pozitivní zpětnou vazbou.

Nejprve se z plné krve izolují granulocyty (centrifugace na kontinuální percollovém gradientu

hustoty). Promytá suspenze granulocytů se stimuluje forbolesterem (aktivátor proteinkinasy C, napodobuje imunitní stimulaci). Měří se produkce superoxidu, a to spektrofotometrickým stanovením redukce tetrazoliového derivátu WST-1 (water soluble tetrazolium).

Thioredoxin je součást peroxiredoxinového systému, který dle nových poznatků má klíčovou roli v odstraňování peroxidu vodíku. Při oxidačním stresu se prudce zvyšuje plasmatická koncentrace thioredoxinu 1. Měří se imunochemicky pomocí nekompetitivní ELISA.

Používají se dvě monoklonální protilátky specifické pro lidský Trx1. Není zkřížená reaktivita s jinými izoenzymy Trx ani s nehumánními Trx.

Thioredoxin se může podílet na regulaci aktivity syntázy oxidu dusnatého a tak se účastnit různým způsobem na funkci oxidu dusnatého (Shao 2002). Superoxid a jemu příbuzné oxidanty mohou inhibovat syntázu oxidu dusnatého. Oxidují také SH- skupiny a aktivují proteinkinázu C. Vitamin E a kyselina lipoová naopak zvyšují počet SH- skupin. Nedostatek selenu snižuje aktivitu TrxR a glutathionperoxidázy (GPx), což má za následek oxidační poškození proteinů (McCarty 1999). Superoxid vytváří s oxidem dusnatým škodlivý peroxinitrit. Před ním chrání tkáň GPx, selenoprotein P a TrxR (Sykes 2000). Selenoproteiny jako TrxR jsou základní součásti buněčné ochrany a udržují optimální antioxidační/oxidační rovnováhu, a to pomocí NOS. Aktivované neutrofily způsobí zvýšení radikálu oxidu dusnatého, který mění intracelulární glutathion na S-nitrosoglutathion. Ten je štěpen TrxR a tak se obnovuje glutathion. *Helicobacter pylori* má 2 proteiny Trx1 a Trx2, které jej chrání před oxidačním stresem (Comtois 2003). Beta-buňky pankreatu jsou velmi citlivé na nedostatek antioxidačních enzymů, jako jsou superoxiddismutáza (SOD), GPx a kataláza. Proto jsou snadno ireversibilně ničeny volnými radikály. Částečně nedostatek antioxidačních enzymů může být částečně nahrazen thioredoxinovým systémem (Bast 2002).

Kromě těchto speciálních biochemických metod jsme sledovali běžné biochemické spektrum lipidového, sacharidového a proteinového metabolismu (LDL cholesterol, HDL cholesterol, celkový cholesterol, albumin, prealbumin, apolipoprotein A, apolipoprotein B, kyselina močová, glukóza, CRP).

4.5. Statistické metody

Pro statistické zpracování výsledků na experimentálních laboratorních potkanech byl použit párový T-test. Statistické zpracování výsledků u pacientů bylo provedeno programem SPSS s využitím modulů GLM (General Linear Model pro opakovaná měření - viz SPSS: Command Syntax Reference, 2007, Chicago, IL 60606-6412, str. 819) a NPAR TESTS (Kolmogorov-Smirnov test pro ověření standardních předpokladů o normálním rozdělení a Kruskal-Wallisův and Friedmannův test pro případ, že pro některé proměnné předpoklady o normálním rozdělení nebyly akceptovatelné). V případě zamítnutí nulové hypotézy o stejnocenném vlivu premedikace (1-Pethidin, 2-Morfin, 3-Bez anestezie) a nebo zamítnutí hypotéz o diferencovaném vlivu časového faktoru (tj. v 1., 2. a 3.odběru) na hladiny všech vybraných indikátorů byla provedena standardní post-hoc analýza metodou LSD (Least Significant Difference t-test) nebo prostřednictvím kontrastů specifikovaných pro opakovaná měření (Comparison of adjacent levels -SPSS). Všechny statistické testy byly porovnávány s kritériální hladinou významnosti $p=0,05$ nebo nižší.

5. Výsledky

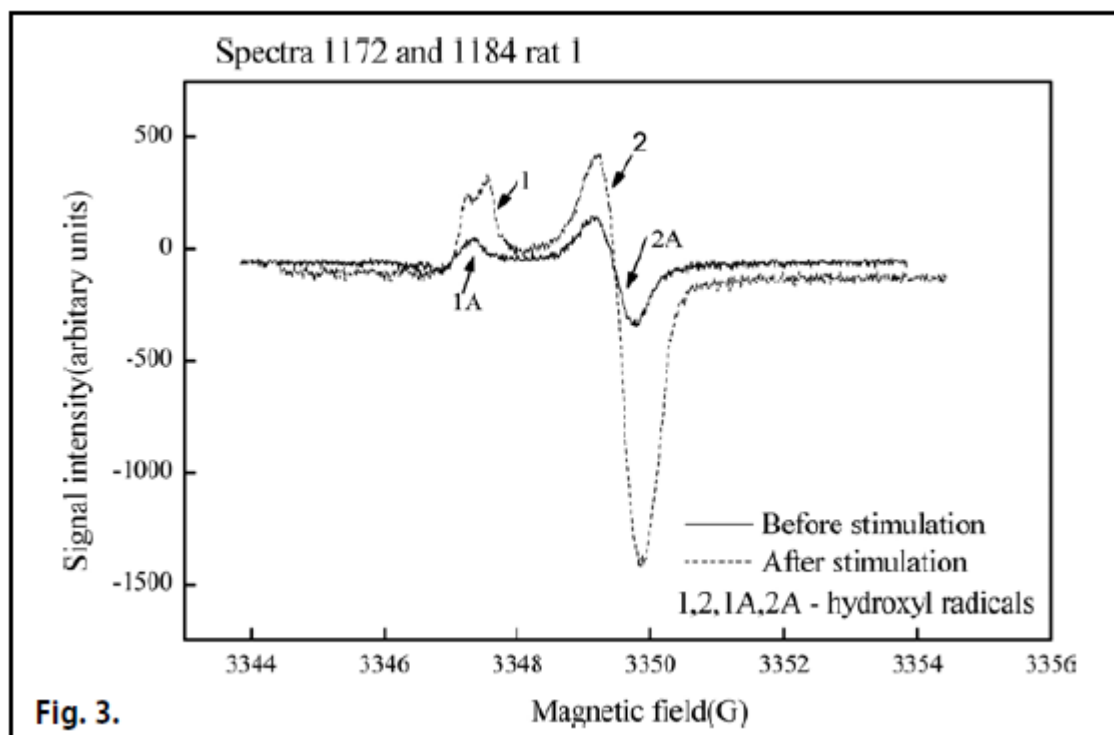
5.1. Experimentální část

Akutní bolest byla nejprve sledována na animálních modelech. Naše výsledky na laboratorních potkanech potvrdili předchozí nálezy o zvyšování volných radikálů po bolestivé stimulaci a jejich opětovné snížení po aplikaci antioxidantů. Prioritním nálezem jsou změny volných radikálů měřených přímou metodou EPR u živých anestetizovaných zvířat.

Po bolestivé stimulaci jsme prokázali výrazný nárůst hydroxylových radikálů ($p = 0.6$) a rovněž se vysoce signifikantně ($p < 0.01$) zvýšily hodnoty singletového kyslíku.

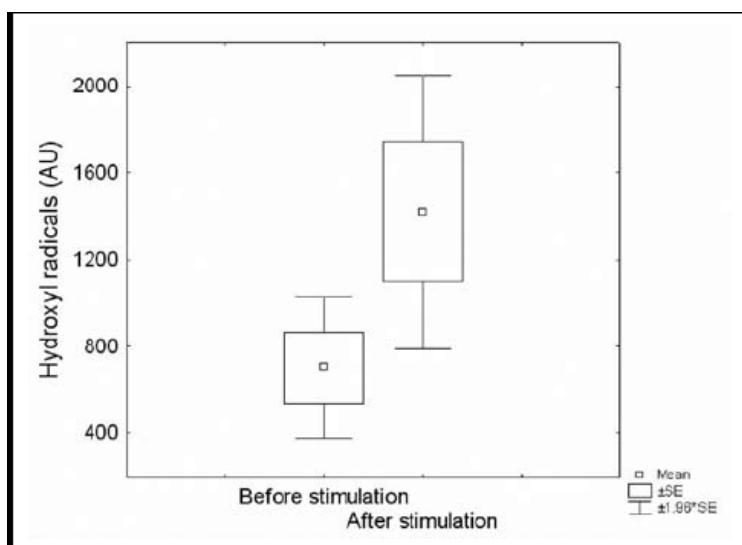
A. Výsledky po mechanické a zánětlivé stimulaci

Obr. 11: Hladina hydroxylových radikálů před a po nociceptivní stimulaci u laboratorního potkana.



Pozorujeme jednoznačné zvýšení hydroxylových radikálů po nociceptivní stimulaci.

Obr.12: Průměrné hodnoty volných hydroxylových radikálů měřených v ocase potkanů před a po bolestivé stimulaci.



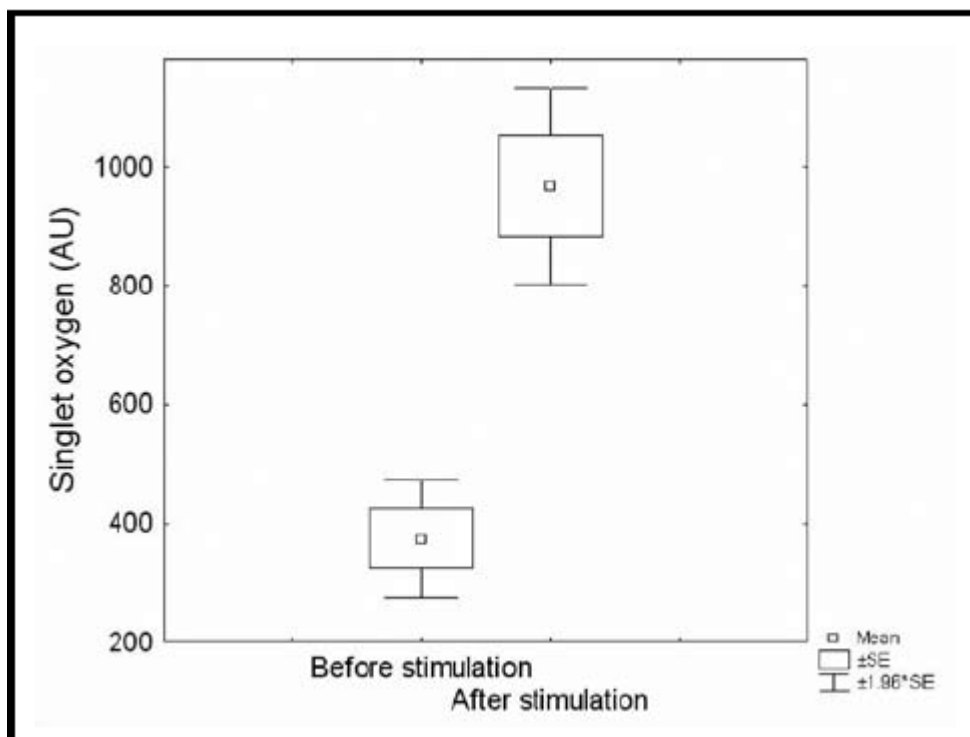
Po stimulaci jsme prokázali výrazný nárůst hydroxylových radikálů ($p = 0.6$)

Tabulka 2: Průměrné hodnoty volných hydroxylových radikálů měřených v ocase potkanů před a po bolestivé stimulaci.

Before stimulation	After stimulation	Difference	Difference in %
376	1460	1084	388.30
235	587	352	249.79
243	438	195	180.25
344	719	375	209.01
634	2370	1736	373.82
170	415	245	244.12
1667	3785	2118	227.05
1011	1134	123	112.17
928	1525	597	164.33
2084	3709	1625	177.98
101	798	697	790.10
653	842	189	128.94
675	685	10	101.48
701.6	1420.5	718.9	257.5

t – value 1.98; $p = 0.6$

Obr.13: Průměrné hodnoty singletového kyslíku před a po nociceptivní stimulaci



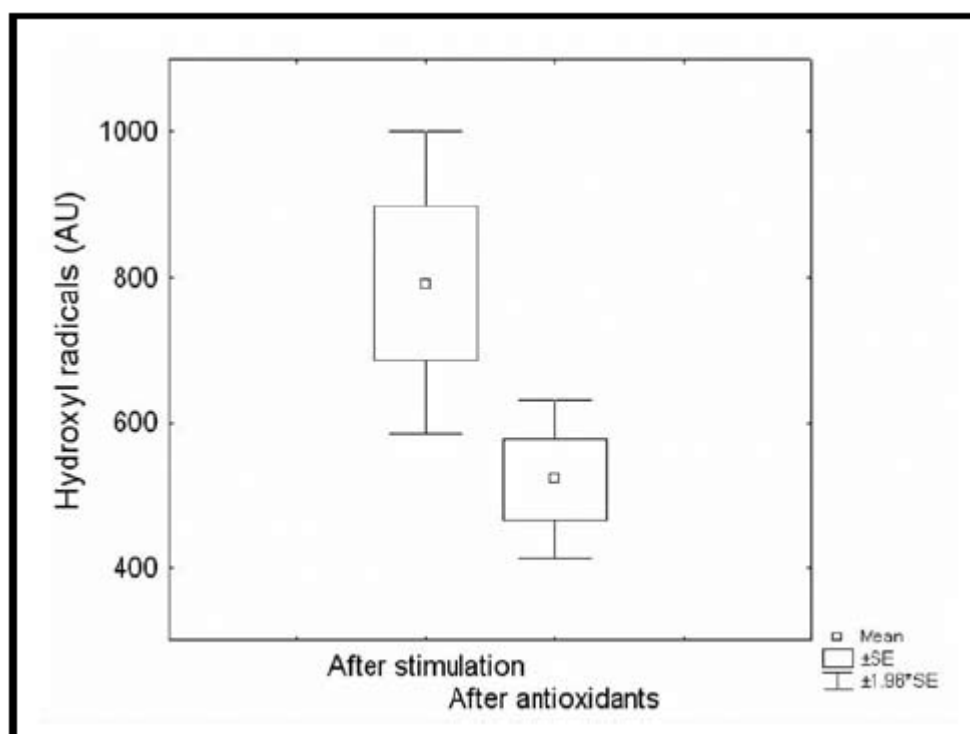
Po stimulaci se vysoce signifikantně ($p < 0.01$) zvýšily hodnoty singletového kyslíku

Tabulka 3 : Průměrné hodnoty singletového kyslíku před a po nociceptivní stimulaci

Before stimulation	After stimulation	Difference	Difference in %
173	1082	909	625.43
489	1089	600	222.70
497	1089	592	219.70
170	415	245	244.12
236	1094	858	463.56
599	737	138	123.04
435	937	502	215.40
432	737	305	170.60
498	1159	661	232.73
216	1330	1114	615.74
374.5	966.9	592.4	313.3

t – value 6.04; $p < 0.01$

Obr. 14: Průměrné hodnoty volných hydroxylových radikálů měřených v ocase potkanů po bolestivé stimulaci a po podání antioxidantů



Po podání směsi antioxidantů (viz metodika) se snižuje nocicepcí zvýšená hladina volných radikálů ($p=0.04$).

Tabulka 4: Průměrné hodnoty volných hydroxylových radikálů měřených v ocase potkanů po bolestivé stimulaci a po podání antioxidantů.

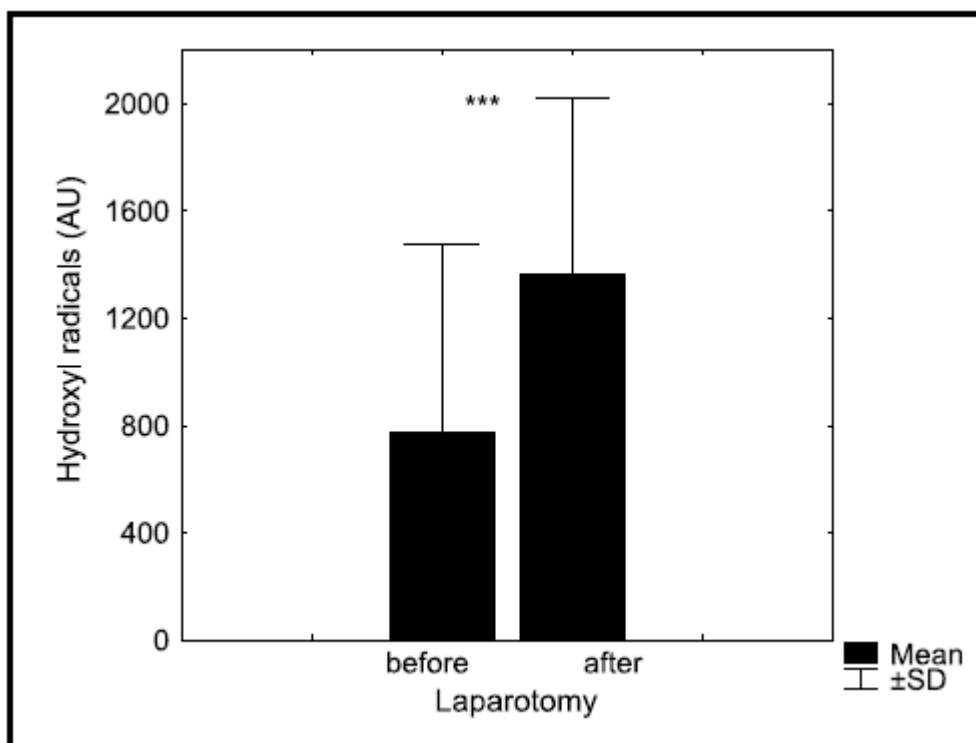
After stimulation	After antioxidants	Difference	Difference in %
1136	632	504	-44
772	719	53	-7
283	256	27	-10
553	418	135	-24
762	407	335	-47
1124	469	665	-58
663	623	40	-6
1049	652	391	-38
792.8	522	268.8	-29.25

t – value 2.26; $p = 0.04$

B. Výsledky po laparotomii

V druhé části animálních experimentů jsme použili metodiku akutní bolesti somatické a viscerální vyvolané laparotomií u laboratorních potkanů. Měřili jsme opět hydroxylové radikály a singletový kyslík před a po operaci a po podání antioxidantů.

Obr. 15: Hydroxylové radikály před a po laparotomii

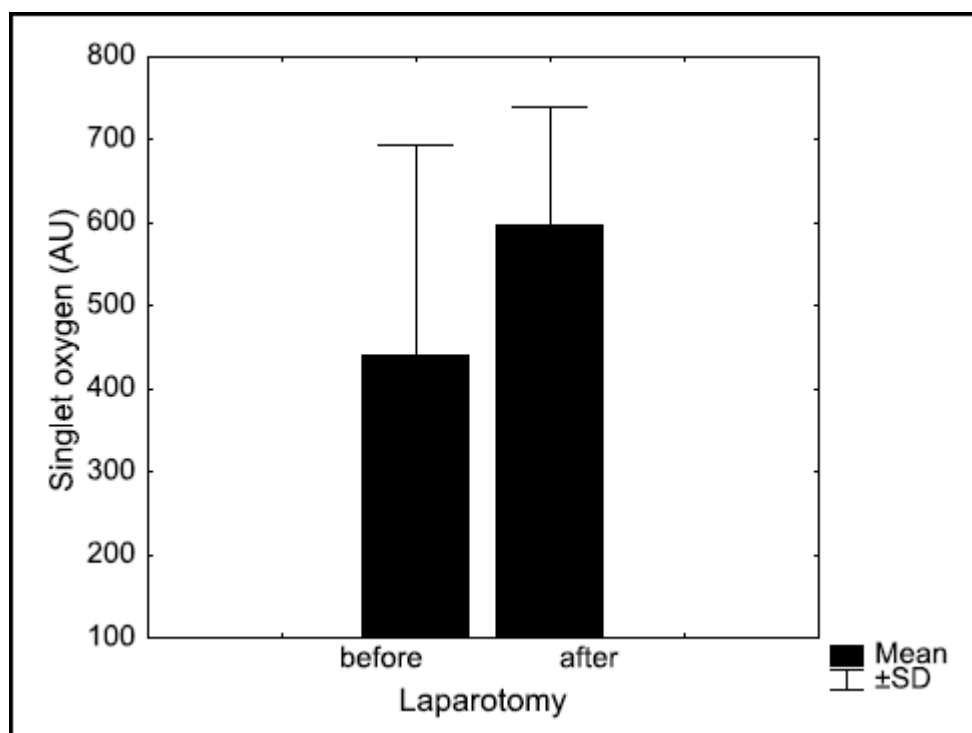


Tabulka 5: Průměrné hodnoty volných hydroxylových radikálů měřených v ocase potkanů před a po bolestivé stimulaci.

	Mean ± SD	N	T test	p
Hydroxyl radical				
Before operation	771 ± 702	21	-4.41	0.0003
After operation	1368 ± 653			

Po laparotomii se hladina volných hydroxylových radikálů vysoce signifikantně zvyšuje ($p=0.0003$).

Obr.16:Hladina singletového kyslíku před a po laparotomii



Tabulka 6: Průměrné hodnoty singletového kyslíku před a po bolestivé stimulaci

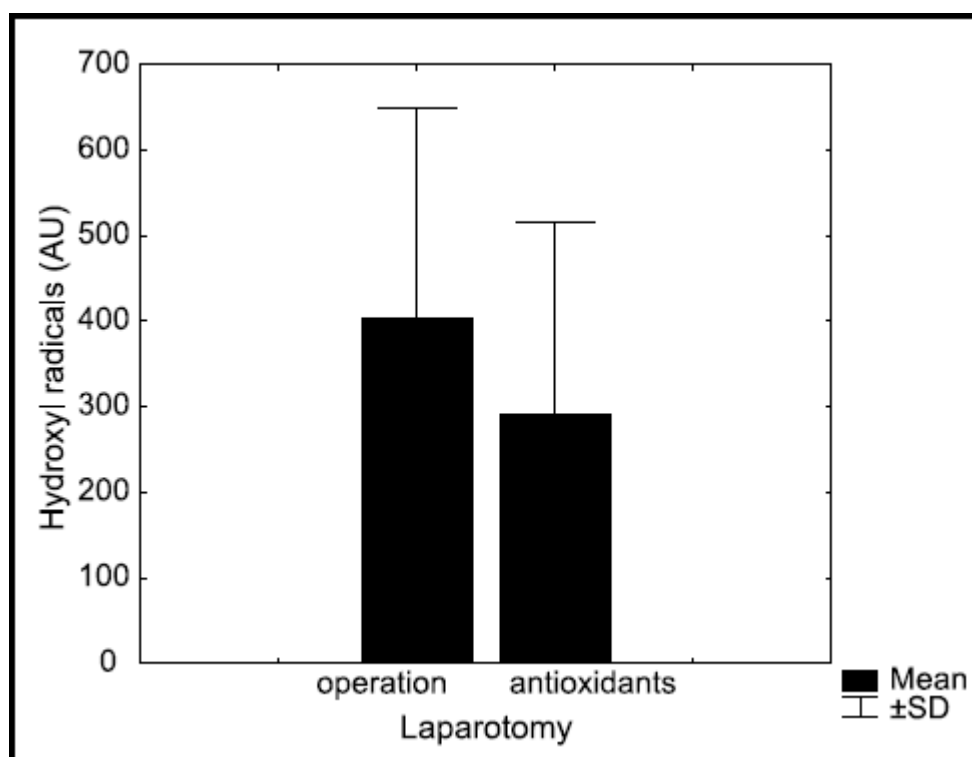
	Mean ± SD	N	T test	p
Singlet oxygen				
Before operation	457 ± 259	11	-2.42	0.036
After operation	597 ± 141			

Hladina singletového kyslíku (Obr.16 a tabulka 6) byla také zvýšena po laparotomii.

Jedné skupině laboratorních potkanů jsme podávali koktejl antioxidantů během pěti po sobě následujících dnů.

Ve skupině, které byla aplikován antioxidační směs, jsme zaznamenali nižší hladiny volných radikálů

Obr. 17: Hladina hydroxylových radikálů před a po laparotomii a po podání antioxidantů



Tabulka 7: Průměrné hodnoty volných hydroxylových radikálů měřených v ocase potkanů po bolestivé stimulaci a po podání antioxidantů

	Mean \pm SD	N	T test	p
Hydroxyl radical after operation and after antioxidants				
After operation	405 \pm 244	11	-2.50	0.031
After antioxidants	293 \pm 238			

Akutní bolest byla nejprve sledována na animálních modelech. Naše výsledky na laboratorních potkanech potvrdili předchozí nálezy o zvyšování volných radikálů po bolestivé stimulaci a jejich opětné snížení po aplikaci antioxidantů. Prioritním nálezem jsou změny volných radikálů měřených přímou metodou EPR u živých anestezovaných zvířat. Metodou EPR spektroskopie „in vivo“ byly studovány laboratorní potkani před a po bolestivé stimulaci. Bylo zjištěno, že se mění koncentrace volných radikálů při srovnání měření EPR spekter před a po bolestivé stimulaci. Bylo zjištěno, že koncentrace volných radikálů po bolestivé stimulaci závisí na množství přidané směsi antioxidantů.

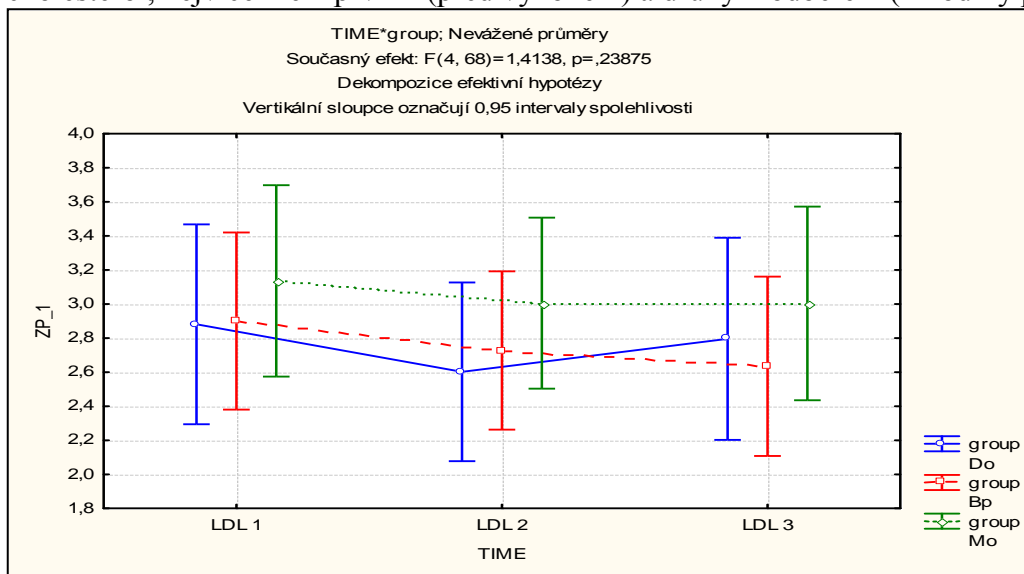
Při mechanické stimulaci (viz metodika) se nejvíce zvýšila koncentrace volných hydroxylových radikálů měřená metodou EPR. Nitroxidové radikály se po nocicepční stimulaci zvýšily až o 10%. Koncentrace singletového kyslíku byla rovněž zvýšena po nocicepční stimulaci. Zvýšená hladina hydroxylových radikálů po nociceptivní stimulaci byla výrazně snížena po podání antioxidantů.

5.2. Výsledky klinická část

Nejprve uvádíme statisticky významné výsledky:

LDL cholesterol

Pokles indexů pro LDL cholesterol je statisticky významný ve skupině pacientů s premedikací Morfin / $p=0.013$ u Friedmanova testu/, snížení je patrné rovněž ve skupině pacientů bez premedikace. Pro všechny tři skupiny pacientů dle premedikací klesá LDL cholesterol, nejvíce mezi prvním (před výkonem) a druhým odběrem (4 hodiny po výkonu).

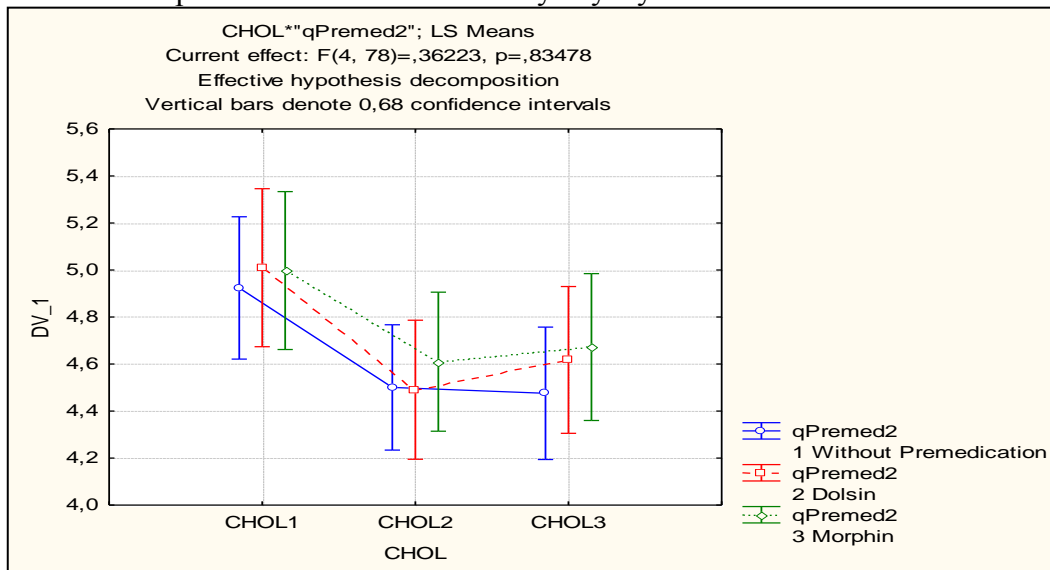


Obr. 18. Hladiny LDL cholesterolu měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

Celkový cholesterol

Hladina cholesterolu klesá mezi prvním a druhým odběrem pro pacienty se všemi druhy premedikací (Pethidin, Morfin, bez premedikace). Pokles hodnot u pacientů po operaci se jeví jako statisticky významný pro pacienty se všemi druhy premedikace.

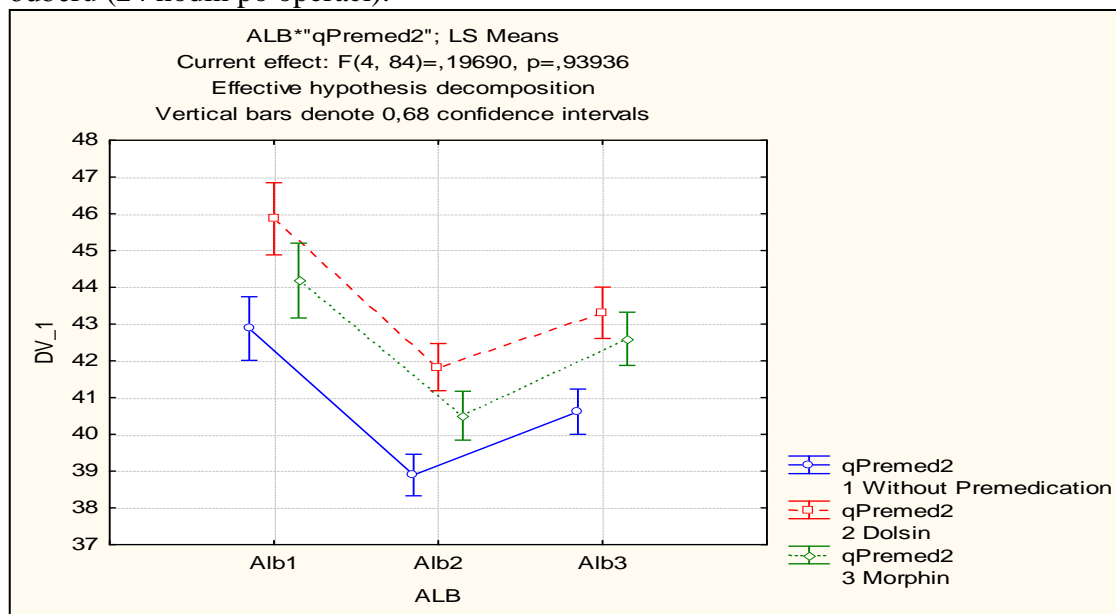
Pouze ve skupině s Pethidinem se hodnoty zvýšily ve třetím odběru.



Obr. 19. Hladiny celkového cholesterolu měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

Albumin

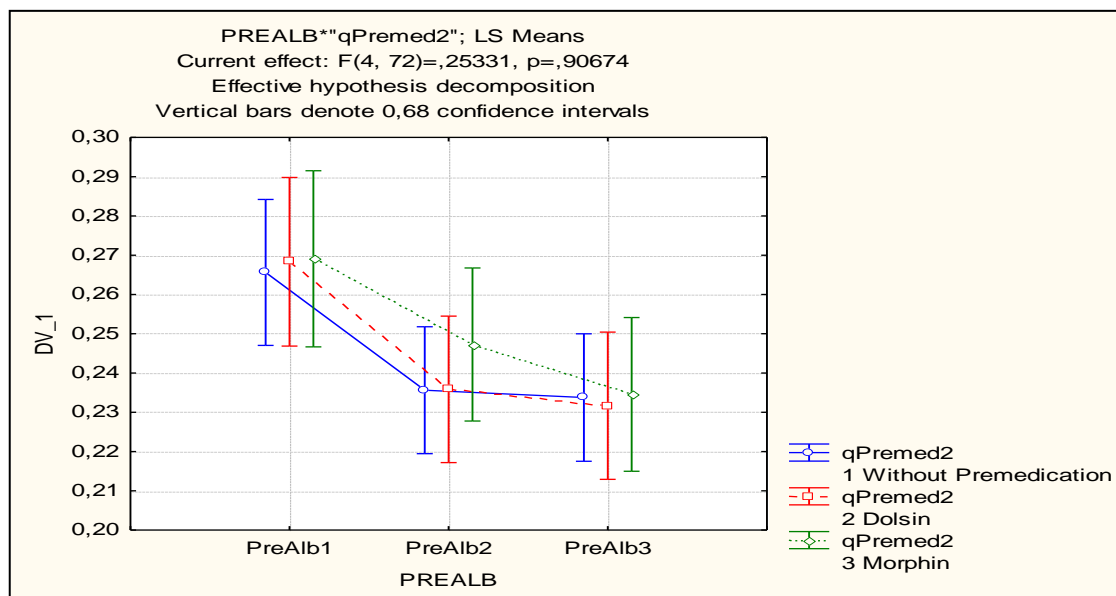
Statisticky významné jsou vyšší hodnoty albuminu u oběru krve pacientů před operací pro všechny typy premedikací / $p < 0.001$. Signifikantně se zvyšuje hladina albuminu po třetím odběru (24 hodin po operaci).



Obr. 20. Hladiny albuminu měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

Prealbumin

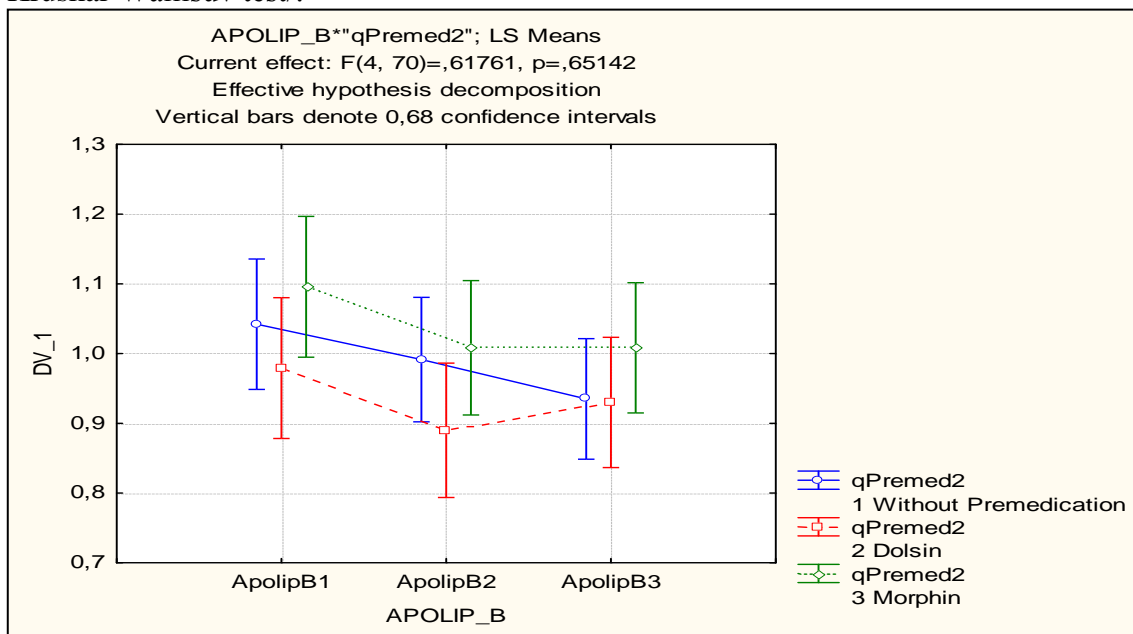
Statisticky významný rozdíl je ve skupině pacientů s premedikací morpfinem / $p = 0.007$ /.



Obr. 21. Hladiny prealbuminu měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

Apolipoprotein B

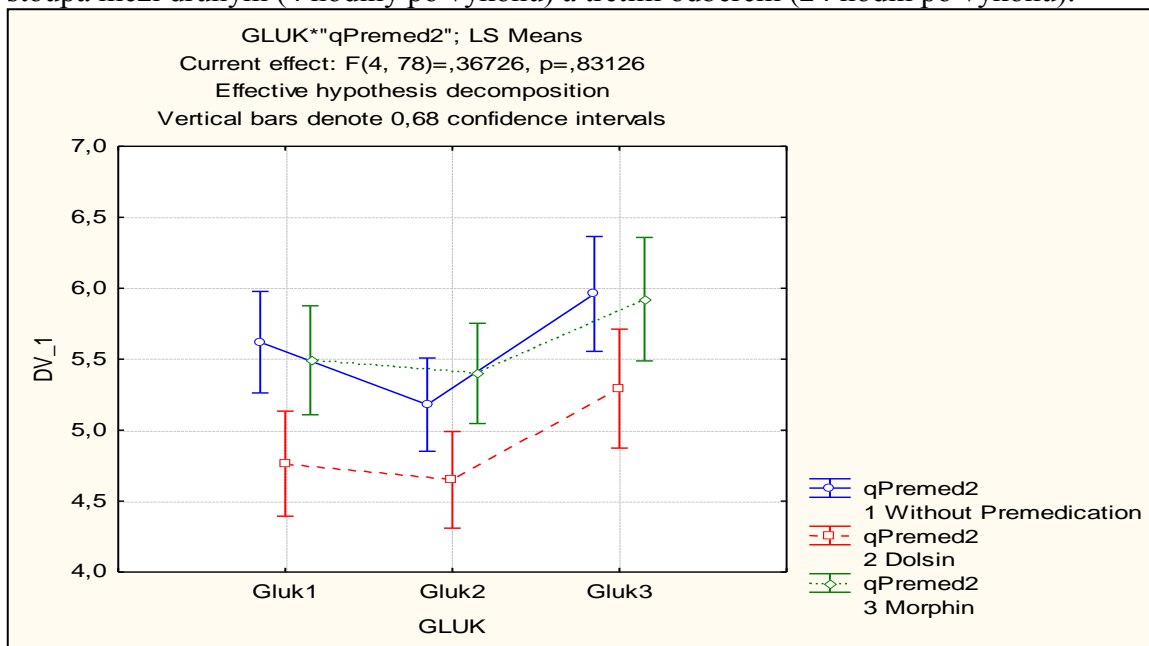
Statisticky významný pokles indexů po-operaci je průkazný pouze pro pacienty, kterým byl podáván morfin / $p=0.021$ pro Friedmannův test. U pacientů pooperaci se statisticky významně diferencují vyšší hodnoty pro Pethidin vůči nižším pro Morphin / $p=0.033$ pro Kruskal-Wallisův test/.



Obr. 22. Hladiny apolipoproteinů B měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

Glukosa

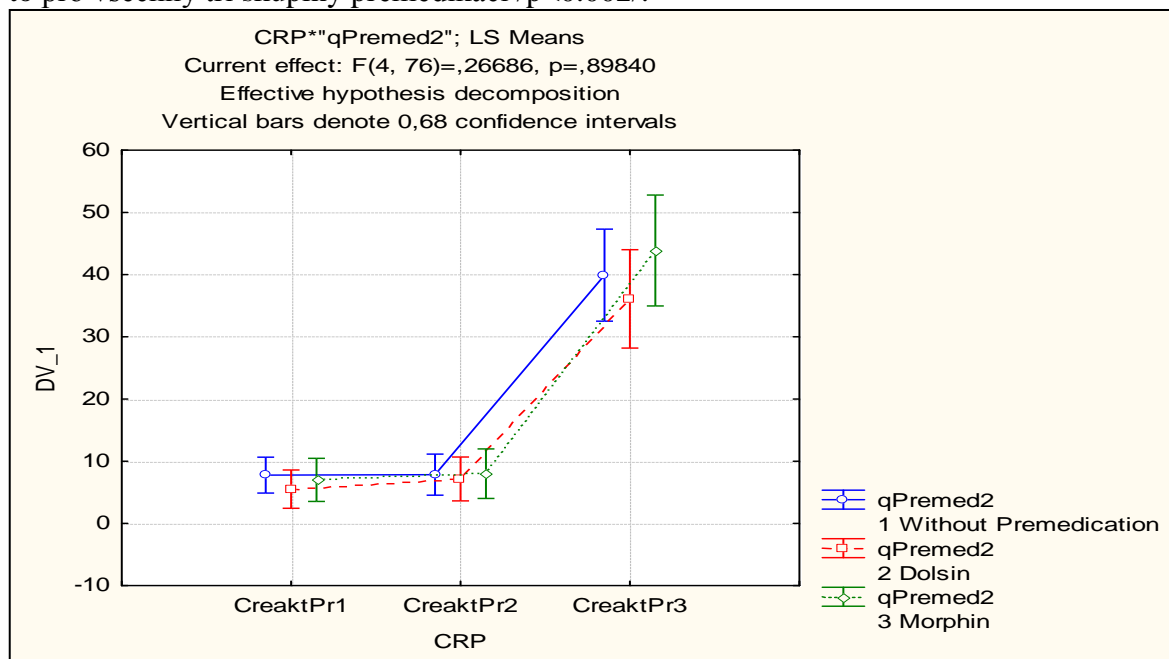
Nárůst hodnot byl vyhodnocen jako statisticky významný pro všechny tři druhy premedikací a stoupá mezi druhým (4 hodiny po výkonu) a třetím odběrem (24 hodin po výkonu).



Obr. 23. Hladiny glukózy měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

CRP

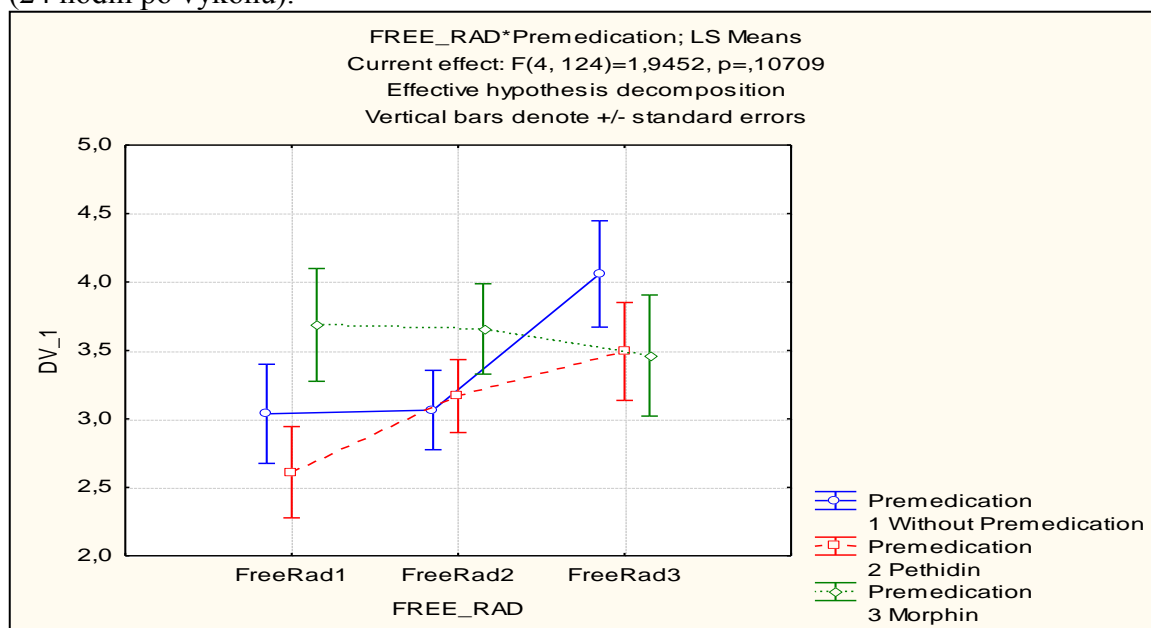
Hodnoty indexů pro pacienty kooperaci jsou statisticky významně vyšší než před operací, a to pro všechny tři skupiny premedikací / $p < 0.002$ /.



Obr. 24. Hladiny CRP měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

Volné radikály

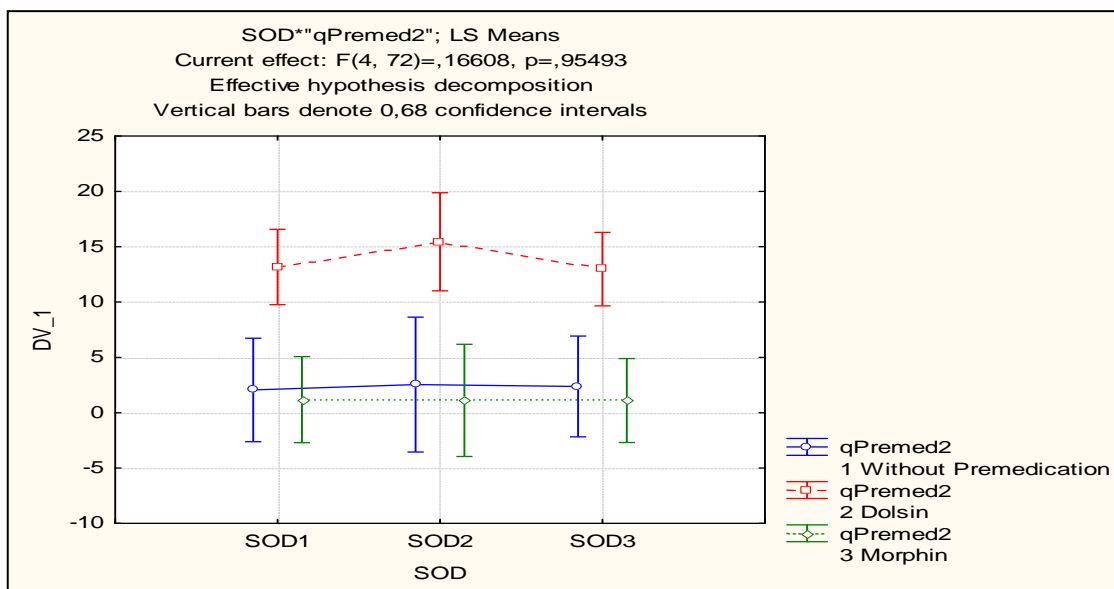
Hladiny volných radikálů se zvyšují u jednotlivých odběrů během pooperačního průběhu u pacientů s premedikací Pethidinu a bez premedikace. Po Morfinu se nesignifikantně snižují zejména ve třetím odběru. Nárůst naměřených hodnot volných radikálů je statisticky významný u pacientů bez premedikace mezi druhým (4 hodiny po výkonu) a třetím odběrem (24 hodin po výkonu).



Obr. 25. Hladiny volných radikálů měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

SOD

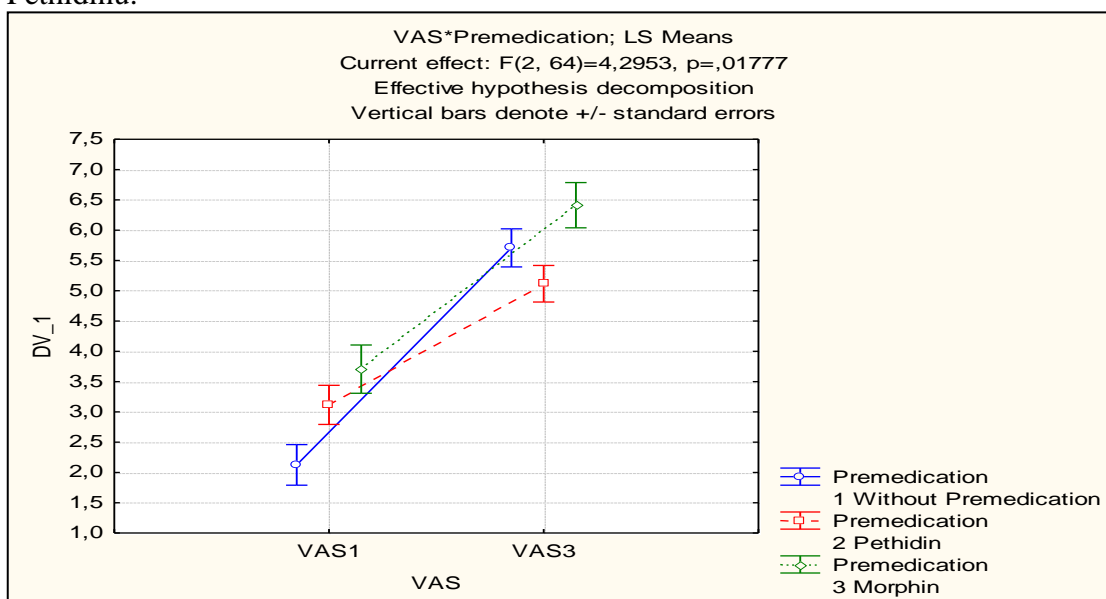
Není rozdíl v průběhu jednotlivých třech odběrů, ale je rozdíl mezi premedikacemi. Nejvyšší hodnoty SOD vykazuje Pethidin, který se statisticky významně liší ($p < 0.005$) jak od hodnot ve skupině bez premedikace, tak po premedikaci Morfinem, který vykazuje nejnižší hodnoty SOD ve všech třech odběrech.



Obr. 26. Hladiny SOD měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

VAS

Hodnoty VAS se statisticky významně liší při obou měření, před premedikací a 24 hodin po operaci ($p < 0,001$). Při srovnání skupin pacientů dle premedikací se statisticky významně liší odpovědi pacientů po Morfinu a bez premedikace před operací, 24 hodin po operaci se lišily nejvýznamněji ($p < 0,001$) hodnoty VAS ve skupinách s premedikacemi Morfinu vůči Pethidinu.

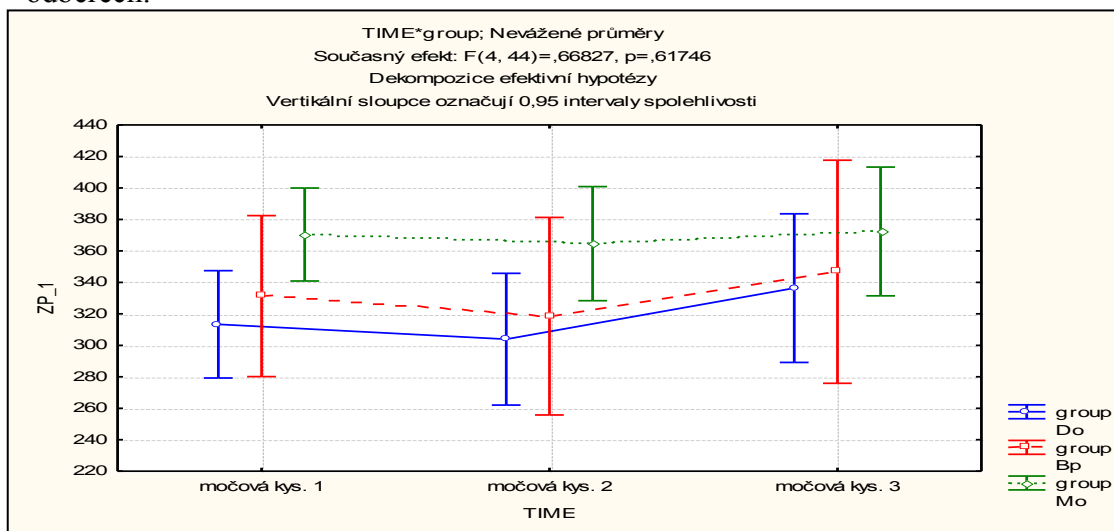


Obr. 27. Hodnoty VAS (Vizuální analogová škála pro měření bolesti) měřené před operací a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

Statisticky nevýznamné rozdíly jsme změřili u kyseliny močové, HDL cholesterolu, triacylglycerolu, celkové bílkoviny:

Kyselina močová

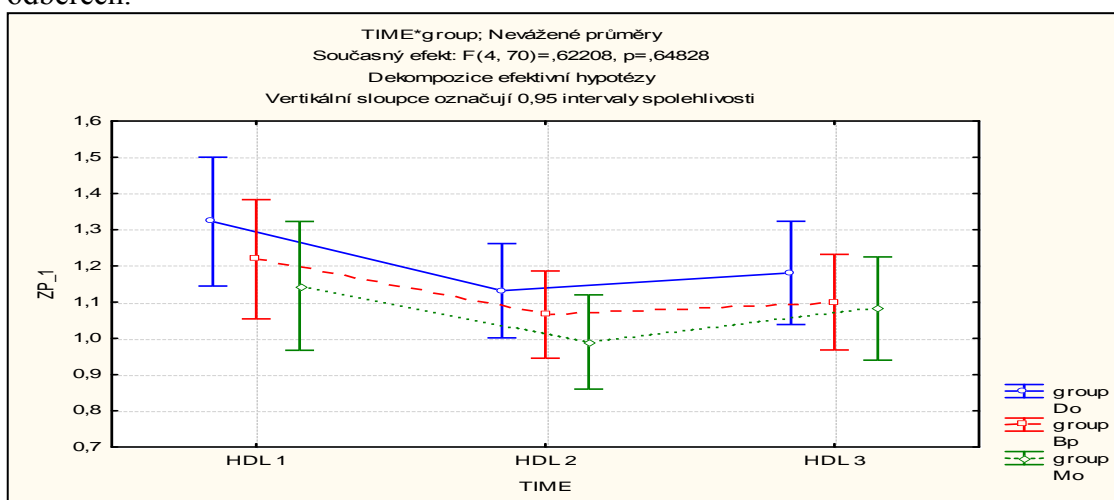
Nezaznamenali jsme žádné statisticky významné rozdíly ve skupinách pacientů s premedikacemi Morfin, Pethidin, bez premedikace ani změny v čase po jednotlivých odběrech.



Obr. 28. Hladiny kyseliny močové měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

HDL cholesterol

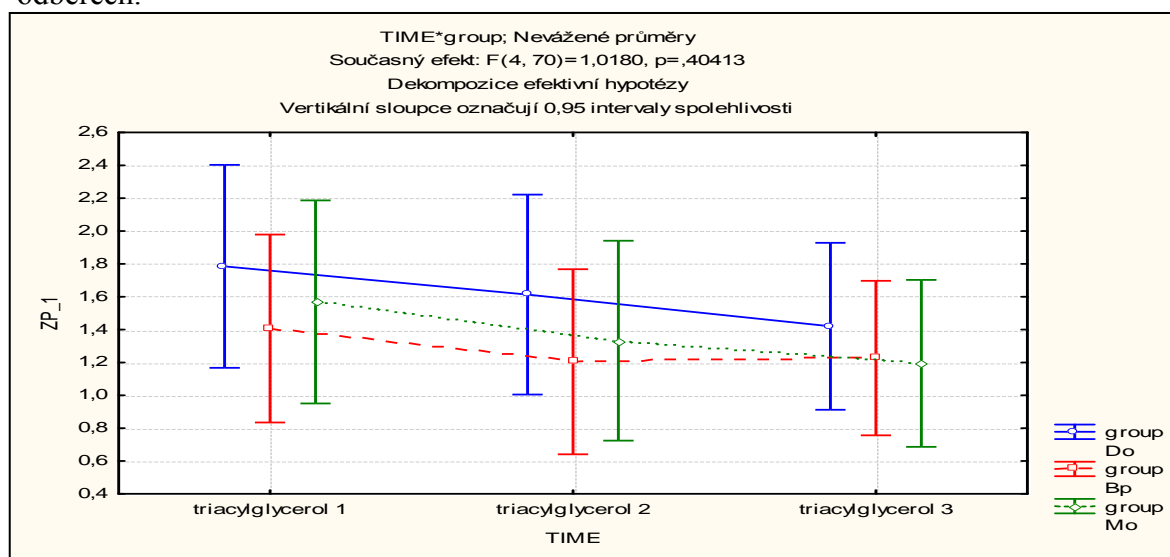
Nezaznamenali jsme žádné statisticky významné rozdíly ve skupinách pacientů s premedikacemi Morfin, Pethidin, bez premedikace ani změny v čase po jednotlivých odběrech.



Obr. 29. Hladiny HDL cholesterolu měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

Triacylglycerol

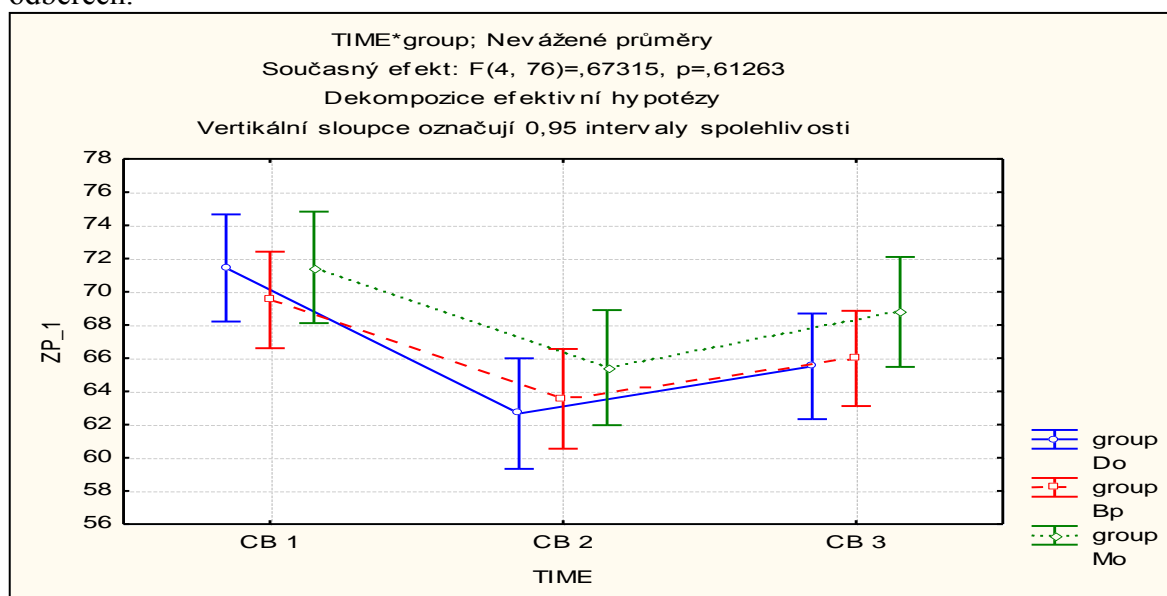
Nezaznamenali jsme žádné statisticky významné rozdíly ve skupinách pacientů s premedikacemi Morfin, Pethidin, bez premedikace ani změny v čase po jednotlivých odběrech.



Obr. 30. Hladiny triacylglycerolu měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

Celková bílkovina

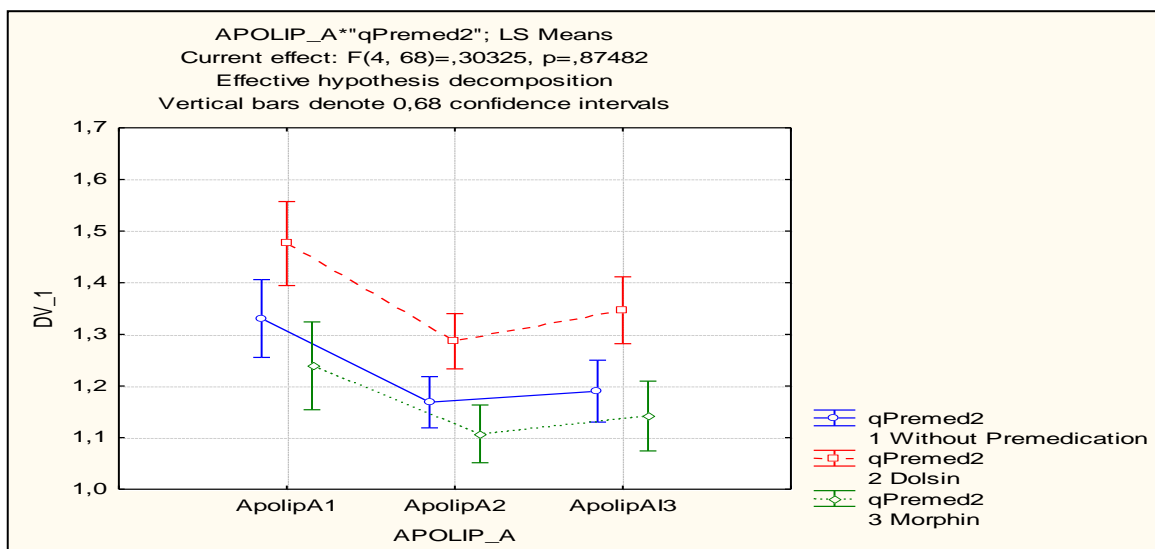
Nezaznamenali jsme žádné statisticky významné rozdíly ve skupinách pacientů s premedikacemi Morfin, Pethidin, bez premedikace ani změny v čase po jednotlivých odběrech.



Obr. 31. Hladiny celkové bílkoviny měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

Apolipoprotein A

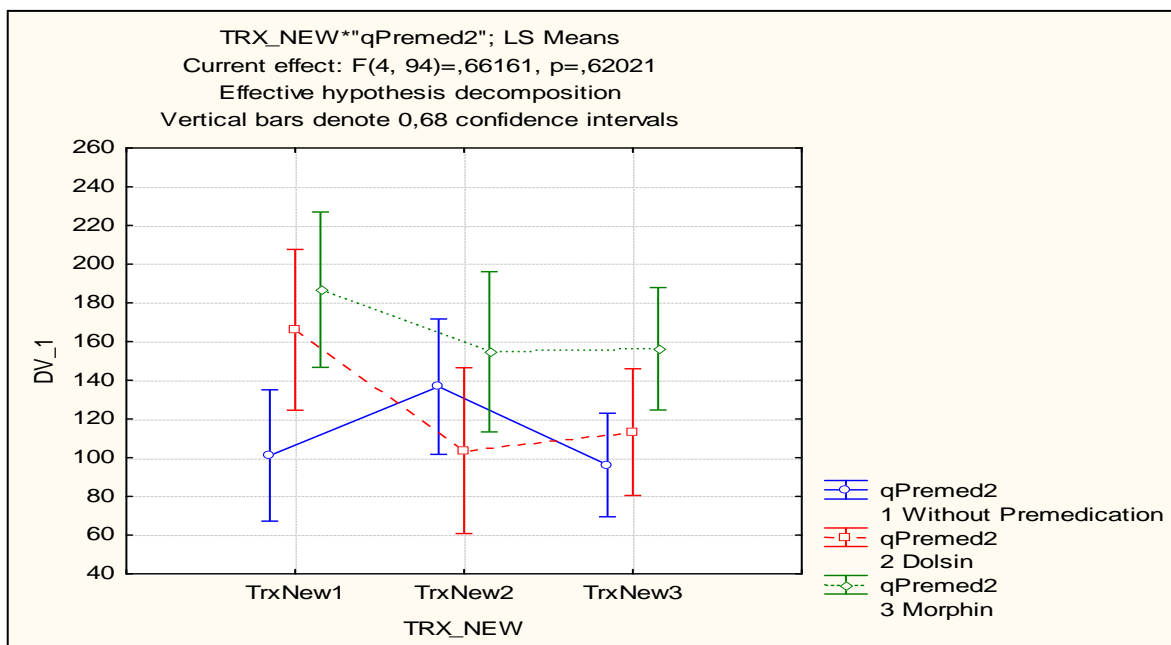
Nezaznamenali jsme žádné statisticky významné rozdíly ve skupinách pacientů s premedikacemi Morfin, Pethidin, bez premedikace ani změny v čase po jednotlivých odběrech.



Obr. 32. Hladiny apolipoproteinů A měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

Thioredoxin

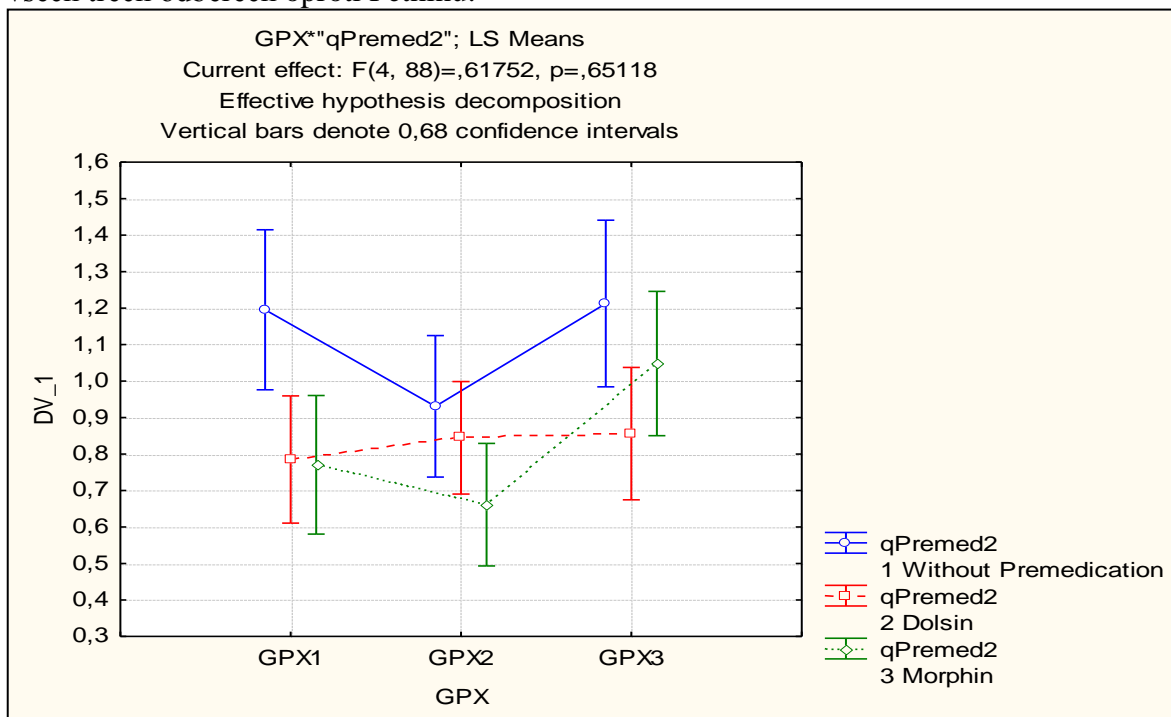
Nezaznamenali jsme žádné statisticky významné rozdíly ve skupinách pacientů s premedikacemi Morfin, Pethidin, bez premedikace ani změny v čase po jednotlivých odběrech.



Obr. 33. Hladiny thioredoxinu měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

GPX

Není rozdíl mezi průběhem jednotlivých odběrů, ale Morfin je nesignifikantně snížen ve všech třech odběrech oproti Pethinu.



Obr. 34. Hladiny glutathionperoxidázy měřené před operací, 4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci u pacientů rozdělených do 3 skupin dle premedikací Pethidin, Morfin a bez premedikace.

Tabulka 8:

Výsledky měření biochemických změn u pacientů s různými druhy premedikací

V tabulce jsou uvedeny průměry (MEAN) a hodnoty SEM pro podílové indexy mezi hodnotami naměřenými ve 2. a 3. odběru(4 hodiny po operaci a 24 hodin po operaci) vůči 1. odběru (před operací a premedikací).

Hodnoty celková bílkovina,prealbumin, apolipoprotein A,Apolipoprotein B, triacylglycerol, cholesterol (celkem), HDL,LDL,CRP a kyselina močová byly v rámci každého individuálního měření přepočteny na hladiny ukazatele albumin.

Premed	Variable	N	1. Before Premedication		2. After Premedication		3. After Surgery	
			MEAN	SEM	MEAN	SEM	MEAN	SEM
Without premedication	Total Proteins	18	69.88	1.46	63.69	0.85	66.57	0.99
	Albumine	18	42.88	1.08	38.89	0.45	40.62	0.61
	Prealbumine	16	0.27	0.02	0.24	0.02	0.23	0.02
	HDL cholesterol	16	1.23	0.07	1.07	0.06	1.11	0.06
	LDL cholesterol	15	2.92	0.20	2.74	0.14	2.65	0.17
	Triacylglycerols	16	1.63	0.29	1.42	0.25	1.39	0.21
	Glucose	15	5.62	0.36	5.18	0.31	5.96	0.46
	Uric acid	6	345.33	19.06	329.33	16.23	355.00	14.17
	CRP	16	7.76	3.70	7.84	3.30	39.91	7.07
	SOD	9	2.06	0.65	2.54	0.84	2.37	0.93
	GPX	12	1.20	0.24	0.93	0.16	1.21	0.20
	NOX nonstim	21	0.88	0.38	0.65	0.50	0.84	0.66
	Free Radicals	22	3.04	0.44	3.06	0.25	4.06	0.44
	VAS	24	2.13	0.36			5.71	0.35
Pethidin	Total Proteins	14	72.37	1.93	63.68	2.29	66.53	2.24
	Albumine	14	45.86	0.92	41.83	0.71	43.31	0.69
	Prealbumine	12	0.27	0.02	0.24	0.02	0.23	0.02
	HDL cholesterol	13	1.29	0.09	1.10	0.06	1.15	0.07
	LDL cholesterol	12	2.91	0.26	2.65	0.25	2.83	0.29
	Triacylglycerols	13	1.84	0.42	1.65	0.43	1.45	0.37
	Glucose	14	4.76	0.19	4.65	0.21	5.29	0.24
	Uric acid	10	323.30	11.78	314.70	13.45	346.40	20.87
	CRP	14	5.51	1.43	7.14	2.73	36.09	7.28
	SOD	17	13.17	5.05	15.45	6.58	12.97	4.91
	GPX	19	0.78	0.19	0.84	0.18	0.86	0.23
	NOX nonstim	20	1.18	0.28	0.62	0.35	0.28	0.37
	Free Radicals	26	2.61	0.31	3.17	0.33	3.49	0.37
	VAS	26	3.12	0.33			5.12	0.34

Tabulka 8-pokračování:

Morphine	Total Proteins	13	71.85	1.07	65.8	1.57	69.51	1.49
	Albumine	13	44.18	0.55	40.51	0.73	42.60	0.72
	Prealbumine	11	0.27	0.02	0.25	0.02	0.23	0.02
	HDL cholesterol	13	1.13	0.08	0.99	0.06	1.08	0.06
	LDL cholesterol	13	3.16	0.30	3.03	0.29	3.05	0.32
	Triacylglycerols	13	1.58	0.18	1.31	0.16	1.20	0.10
	Glucose	13	5.49	0.50	5.40	0.47	5.92	0.50
	Uric acid	13	366.77	17.16	361.77	21.31	372.15	21.05
	CRP	11	7.00	3.45	8.00	4.82	43.87	10.06
	SOD	13	1.18	0.20	1.11	0.12	1.10	0.17
	GPX	16	0.77	0.16	0.66	0.14	1.05	0.13
	NOX nonstim	16	1.16	0.27	-0.12	0.31	-0.04	0.28
	Free Radicals	17	3.69	0.32	3.66	0.23	3.46	0.31
	VAS	17	3.71	0.32			6.41	0.17

6.Diskuze

V naší studii jsme odpověděli na hypotézy takto:

1. Jak působí akutní bolest na organismus a je možné tyto změny změřit a popsat?
Akutní bolest zvyšuje volné radikály zejména hydroxylové a nitroxidové a také další marker oxidačního stresu singletový kyslík. To jsme prokázali experimentálně u laboratorních potkanů. Prioritním nálezem je zavedení metody přímého měření volných radikálů a singletového kyslíku v ocase živých anestezovaných zvířat.
2. Je možná objektivní evaluace akutní bolesti použitím různých biochemických parametrů a zejména volných radikálů? Objektivní evaluace bolesti je možná nejen u akutní bolesti, ale i u opakované akutní bolesti a velmi pravděpodobně i u bolesti chronické. Důležitým nálezem je i možnost sledování průběhu změn volných radikálů a singletového kyslíku po podání antioxidantů. Prokázali jsme, že námi navržená kombinace antioxidantů snižuje bolesti zvýšené volné hydroxylové radikály a singletový kyslík.
3. Kterým typem analgetik dosáhneme kvalitní preemptivní a následně pooperační analgésie? Idea, že akutní pooperační bolest může být intenzifikována a fixována stavem neurální hyperexcitability, která byla způsobena chirurgickým výkonem byla objevena už v roce 1913 a následně za mnoho let myšlenku formuloval Wall (1988), který také předpokládal, že preemptivní předoperační analgésie může pomoci blokovat centrální neuronální senzitivizaci a redukovat akutní pooperační bolest. Preemptivní analgésie a její skutečný vliv na vznik a vývoj pooperační bolesti je diskutován několik let. Stejně tak definice preemptivní analgésie není jednotná a v současné době se více uvažuje o termínu preventivní analgézii. Preemptivní analgésie je a byla často označována různými termíny jako protektivní analgésie, balancovaná periemptivní analgésie, preemptivní předoperační analgezie.
4. Zde kromě nalezení optimální preemptivní a pooperační analgezie lze rovněž objasnit společné mechanismy pooperační bolesti a oxidačního stresu. Je známo, morfin má silný antioxidační efekt in vitro oproti různým antioxidantům v jako je Tokoferol. Z našich výsledků vyplývá, že antioxidační aktivita morfinu byla závislá na jeho koncentraci a na inhibici lipidové peroxidace. Pethidin je syntetická látka s velmi silným analgetickým účinkem. Pethidin se ukázal jako jeden z nejúčinnějších léčebných prostředků k zabránění pooperačního třesu

(Terasako 2000). V současné době je však jeho používání v indikaci preemptivní analgezie a léčby bolesti obecně značně sporné a to nejen vzhledem k jeho nežádoucím účinkům.

Oxidační stres vzniká z nerovnováhy mezi tvorbou volných radikálů a anti-oxidačního druhů. Volné radikály mohou poškodit řadu buněčných funkcí prostřednictvím lipoperoxidace, oxidace proteinů, zničením DNA a nitrací albuminů. Existují dvě možná vysvětlení pro model bolestivé stimulace. Volné radikály mohou mít také jiný původ, jako je například kyselina močová a mohou být generovány z xanthinoxidázy a z nekrotizovaných buněk se může vytvořit superoxid.

V tomto a v předchozích pokusech jsme prokázali zvýšenou tvorbu volných radikálů v mozkové kůře u pokusných potkanů (Pekárková et al 2001) a také zvýšenou hladinu volných radikálů v krvi pacientů (Kirk & White 2006; Křikava et al 2004; Karbownik-Lewinska et al 2007).

Jak mohou být vysvětleny změny hladiny singletového kyslíku (Stief 2003; Sies 1989)? Stres velmi pravděpodobně ovlivňuje synaptickou plasticitu, dendritickou morfologii a je schopen vyvolat neurotoxické poškození u lidí a to hlavně tvorbou volných radikálů.

Dlouhodobý stres vyvolává snížení hladiny glutathionu (GSH) (Brucknerová et al 2006).

Vitamin E je zřejmě účinný při obnově vlastního anti-oxidačního systému, nebyl prokázán žádný aditivní efekt v kombinované vitaminové léčbě (Zaidi & Banu 2004). Oxidační stres je důležitým patofyziologickým mechanismem mnoha neurologických chorob. Reaktivní formy kyslíku a dusíku byly opakovaně citovány jako molekuly zapojené do nocicepčních procesů (Cini et al 1994; Kim et al 2004). Patofyziologie chronické a přetrvávající bolesti je výsledkem účinku prooxidativních látek. Reaktivní formy kyslíku (ROS) přispívají k prodloužení a udržení a nastartování chronické bolesti. Některé pre-klinické zprávy ukazují, že antioxidanty by mohly být účinnými analgetiky v neuropatických a zánětlivých modelech bolesti. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou zapojeny v řetězci neuropatické bolesti.

Opakované denní injekce s nízkou dávkou vitamínu E výrazně snížily neuropatickou bolest.

Vitamin E byl také účinný při analgezii podávané intratekálně (Kim 2004, 2006).

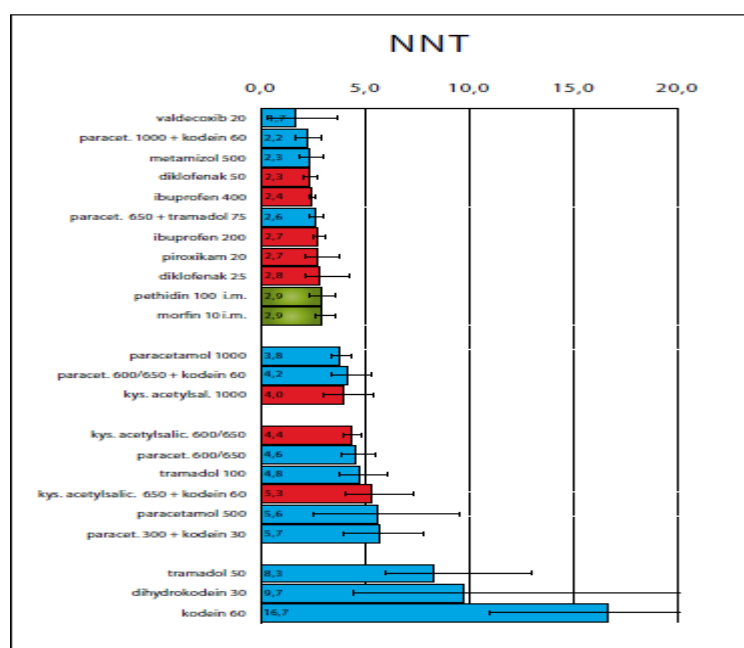
Byl také sledován vztah mezi oxidací proteinů a funkčním stavem organismů, a to zejména při stárnutí, hyperoxii, hypoxii a teplotním šoku. Vitamin E poskytuje ochranu před oxidačním stresem a je účinným scavengerem singletového kyslíku.

Nejvíce superoxidu je tvořeno prostřednictvím metabolismu. Analyzovali jsme nárůst superoxidu s ohledem na bolest, protože superoxid je méně nebezpečný než hydroxylové radikály nebo singletový kyslík. Volné radikály mohou vyvolávat četné metabolické změny. Hydroxyl peroxid je redukován zejména enzymy, jako je kataláza a glutathion oxidáza. Hydroxyl peroxid není volný radikál, ale má podobné vlastnosti a navíc je také schopen proniknout buněčných membrán. Nicméně, superoxid reaguje 3,5 krát rychleji s nitroxidovým radikálem a může reagovat dříve, než proběhne přeměna na kyslík a vodík a může být katalyzována SOD: $O_2\cdot- + NO \rightarrow ONOO-$ (peroxinitrit).

Hladina mitochondriálních ROS je zvýšena u potkanů při neuropatické bolesti v dorzálních kořenech. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou toxické látky, které mohou být zapojeny do různých neurodegenerativních onemocnění. Zvýšení mitochondriálního ROS je způsobeno mechanismem centrální senzitivace u neuropatické bolesti u potkanů (Park 2006).

Akutní bolest a preemptivní analgésie

Stejně tak pojem preventivní analgezie, který by byl nejlogičtějším pojmem je třeba pečlivě přehodnotit, protože data z randomizovaných studií o načasování aplikace před ve srovnání s podáváním analgetik po chirurgickém podnětu přinesly matoucí zjištění. Studie, které porovnávaly stejnou dávku analgetika podaného před a po chirurgickém výkonu nepřineslo potvrzení výhod preemptivní analgezie. Přestože předoperační podání analgetik bylo jednoznačně lepší než podávání placebo, několik dobře-kontrolovaných studií skutečně porovnávalo perioperační versus pooperační podávání stejné analgetické dávky (Dahl 2000).



Obr 35: Schéma NNT pro analgetika podávané při akutní bolesti (podle Moora 2003)

NNT (Number Need to Treat) hodnota udává, kolik pacientů nereagujících na placebo je nutné léčit, abychom alespoň u jednoho pacienta zaznamenali 50% úlevu bolesti. Čím nižší je číslo NNT, tím vyšší je pravděpodobnost, že léčivo bude dobře tlumit bolest. Údaje představují výsledky četných metaanalýz a desítek kontrolovaných studií ze stovek až tisíců pacientů u každého analgetika. Důležitý poznatek, že ani nejsilnější analgetikum nemusí zabrat u každého, zdůrazňuje to právě NNT hodnota (Kršiak 2004).

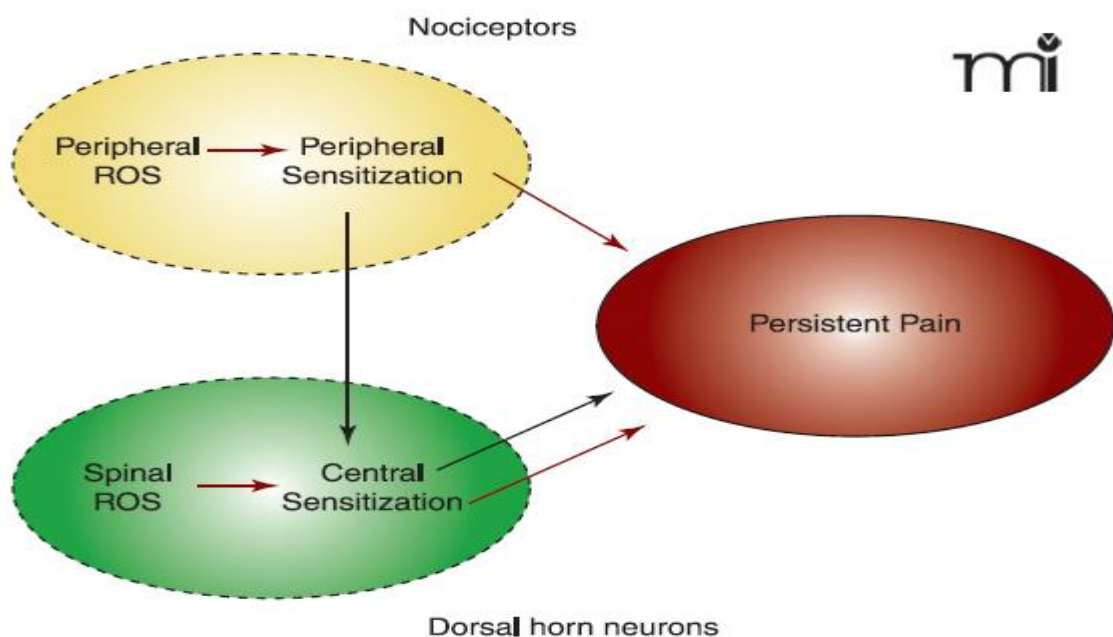
Bylo provedeno několik dalších klinických studií – randomizovaných, dvojité zaslepých za účelem potvrzení nebo vyvrácení benefitu preemptivní analgésie. Mnoho nejistých a neurčitých výsledků pravděpodobně jsou reflexí na fakt, že operační a pooperační stimuly doprovázejí centrální senzitivizaci.

Katz a McCartney (2003) studovali skupinu 175 pacientů, studie byla kontrolovaná, dvojité slepá a trvala od roku 1987 do roku 2002. Autoři hodnotili v rámci preemptivní analgésie lokální anestetika, opioidy, NSAID, NMDA agonisty, klonidin, lokální anestetika v kombinaci s opioidy a multimodální analgézi. Shrnují, že podíl jednotlivých analgetik na preventivním analgetickém efektu je signifikantně větší než kdyby pacient byl bez analgetické léčby. Například hodnotili také lokální anestetika a to podáním před tonsilektomií nebo před herniotomií a objevili skutečné signifikantní snížení pooperační bolesti déle než je prokázána účinnost jednotlivých lokálních anestetik. Studie zkoumaly také načasování podání analgetik-opioidů s nebo bez lokálních anestetik, výsledky byly málo přesvědčivé, možná díky toleranci k opioidům a opioidy navozená hyperalgie (Celerier 2000).

Perzistentní chronická bolest

Mechanismy chronické nebo perzistentní bolesti (například bolest spojená se zánětem nervu nebo zraněním), se zásadně liší od akutní bolesti (někdy označovaná jako nocicepční bolest nebo fyziologická bolest). V akutní bolesti, jsou škodlivé podněty šířeny nociceptory a informace jsou přenášeny do mozku. Perzistentní bolest je udržována periferní nebo centrální senzitivizací. Častou příčinou nastartování periferní senzitivizace je zánět. Periferní senzitivizace vyvolává centrální senzitivizaci, která může být zachována s nebo bez periferní senzitivizací. Receptory N-methyl-d-aspartátu (NMDA) jsou považovány za zprostředkovatele centrální senzitivizace (Chung 2004).

mi



58

ROS, jako 8-iso-prostaglandinu F2 a hydroxyeicosatetraenoic kyseliny v peritoneu u pacientů v čase-a CO2 objem-dependentní způsobem a malondialdehydu ve střevě, játrech a plicích u potkanů. Navíc byla pozorována negativní korelace mezi scavengery ROS jako GSH-Px, SOD, CAT a GSH, a doba trvání / množství CO2 expozice.

7. Závěry

Naším cílem bylo posoudit změny volných radikálů a dalších biochemických ukazatelů po nociceptivní stimulaci u různých experimentálních animálních modelů. U pacientů jsme zjišťovali, zda preemptivní analgezie měla pozitivní účinek na akutní pooperační bolest. Objektivní hodnocení intenzity bolesti je dlouhodobý problém, protože objektivizace pomocí elektrofyziologických a zobrazovacích metod je v současné době náročná a drahá, a proto se v laboratořích v České republice a mnoha dalších místech provádí hodnocení pomocí biochemických metod.

Realizovali jsme experimentální studie s použitím mechanické, zánětlivé a viscerální nocicepce a zjistili jsme, že zejména, hydroxylové a nitroxidové volné radikály a singletový kyslík se výrazně zvýšily bolestivě nociceptivní stimulaci. Toto zvýšení může být potlačeno antioxidanty. Současně jsme prokázali, že některé parametry metabolismu lipidů, sacharidů a bílkovin byly rovněž změněny. Měřili jsme zejména volné hydroxylové radikály a singletový kyslík metodou EPR v ocase živých a anestezovaných laboratorních potkanů. Tato metoda je zcela prioritní a nebyla nikdy před tím použita. Již dřívější experimentální výsledky byly částečně ověřeny s použitím různých typů akutní a chronické bolesti u lidí (akutní pankreatitida, zlomeniny, cholecystitida, bolesti viscerálního původu a bolesti dolních zad). Všechny tyto bolestivé syndromy mají různé biochemické změny.

Naším dalším cílem bylo nalézt nejúčinnější analgetickou kombinaci pro efektivní léčbu akutní pooperační bolesti.

Studovali jsme pooperační analgezii a její účinky zahrnující různé typy předoperační a pooperační medikace a její objektivní hodnocení. Zaměřili jsme se na objektivní hodnocení bolesti pomocí různých biochemických parametrů, zejména na volné radikály, které se výrazně měnily během akutní bolesti. Kromě nalezení optimální preemptivní a pooperační analgezie, jsme se pokusili vysvětlit společné mechanismy pooperační bolesti a oxidační stresu. Podařilo se nám objektivizovat biochemické změny při akutní pooperační bolesti na podkladě pooperačního stresu.

Tato studie představuje kombinaci experimentálního přístupu k řešení změn vznikajících při různých typech bolesti a klinické aplikace vlivu preemptivní analgezie na průběh pooperační bolesti.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem 0021620816, Patofyziologie neuropsychiatrických onemocnění a její klinické aplikace.

8.Literatura

- 1) Andrew D, Greenspan JD. Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors after peripheral inflammation in the rat. *J Neurophysiol* 1999;82:26,49–56.
- 2) Aasvang E, Kehlet H. Chronic postoperative pain-the case of inguinal herniorrhaphy. *Br J Anaesth* 2005;95:69–76.
- 3) Augoulea A, Mastorakos G, Lambrinoudaki I, Christodoulakos G, Creatsas G The role of the oxidative-stress in the endometriosis-related infertility *Gynecol Endocrinol*. 2009;25(2):75-81. Review.
- 4) Bast, A., Wolf, G., Oberbaumer, I., Walther, R.: Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2002, 45, 6, 867 – 876
- 5) Brucknerová I., Benedeková M., Pechán I., Holomán K., Bielíková E., Kostrová A., Ujházy E., Dubovický M., Mach M. Delivery as a „physiological stress“ and its influence on some parameters of oxidative stress. *Neuroendocrinology Letters* 2006; 27 (2): 65-68
- 6) Baier-Bitterlich G., Fuchs D., Wachter H.: 7,8-Dihydroneopterin upregulates interferon-gamma promoter in T cells. *Immunobiology* 1996, 196, 4, 350-355
- 7) Bengmark S.: Advanced glycation and lipoxidation end products-amplifiers of inflammation: the role of food. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* 2007; 31(5):430-40.
- 8) Binda MM, Molinas CR, Bastidas A, Koninckx PR. Reactive oxygen species and adhesion formation: clinical implications in adhesion prevention. *Surg Endosc.* 2007;21(10):1826-34..
- 9) Bonomini F., Tengattini S., Fabiano A., Bianchi R., Rezzani R.: Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol. Histopathol.* 2008; 23(3):381-90.
- 10) Bengmark S., Gil A.: Bioecological and nutritional control of disease: prebiotics and synbiotics. *Nutr. Hosp.* 2006; 21, Suppl.2:72-86
- 11) Bove GM, Ransil BJ, Lin H, Leem J. Inflammation induces ectopic mechanical sensitivity in axons of nociceptors innervating deep tissues. *J Neurophysiol* 2003;90:1949–55.
- 12) Célèrier E, Laulin J, Larcher A, Le Moal M, Simonnet G., Evidence for opiate-activated NMDA processes masking opiate analgesia in rats.,*Brain Res.* 1999;13;847(1):18-25.
- 13) Chung JM. The role of reactive oxygen species (ROS) in persistent pain. *Mol Interv.* 2004 t;4(5):248-50.
- 14) Cini M., Farielo RTG, Bianchetti A., Moretti A. Studies on lipid peroxidation in the rat brain. *Neurochem Res.* 1994; 19: 283-288
- 15) Costabel U., Maier K., Teschler H. and Wang Y.M, Local immune components in chronic obstructive pulmonary disease, *Respiration* 1 1992; 17–19.
- 16) Collier HO, Roy AC Morphine-like drugs inhibit the stimulation of E prostaglandins of cyclic AMP formation by rat brain homogenate. *Nature* 1974; 248:24–27.
- 17) Comtois, S. L., Gidley, M. D., Kelly, D. J.: Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 2003; 149, 1, 121 – 129
- 18) Cunha TM, Roman-Campos D, Lotufo CM, Duarte HL, Souza GR, Verri WA Jr, Funez MI,

- Dias QM, Schivo IR, Domingues AC, Sachs D, Chiavegatto S, Teixeira MM, Hothersall JS, Cruz JS, Cunha FQ, Ferreira SH Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 2;107(9):4442-7.
- 19) Dahl V, Ernoe PE, Steen T, Raeder JC, White PF: Does ketamine have preemptive effects in women undergoing abdominal hysterectomy procedures? *Anesth Analg* 2000; 90:1419–22
 - 20) Davies MJ. The oxidative environment and protein damage: *Biochim Biophys Acta*. 2005; 17;1703(2):93-109.
 - 21) Chung: The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Persistent Pain, *Mol Interv*. 2004; 4(5):248-50.
 - 22) Escobar JA., Rubio MA., Lissi EA. SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 20 (3): 285-290
 - 23) Fliss H. and Medard M., Rapid neutrophil accumulation and protein oxidation in irradiated rat lungs, *J. Appl. Physiol* 1996;. **77**, 2727–2733
 - 24) Gülçin I, Beydemir S, Alici HA, Elmastaş M, Büyükkuroğlu ME. In vitro antioxidant properties of morphine, *Pharmacol Res.* 2004 ;49(1):59-66.
 - 25) Hacimuftuoglu A., Handy CR., Goettl VM. Lin CG., Dane S., Stephanes RL Jr. Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. *Behav Brain Research* 2006; 173 (2): 211-216
 - 26) Holeček V, Rokyta R , Stopka P,Vlasák V, Singletový kyslík (¹O₂), jeho přeměny a biologické účinky, *Československá fyziologie* 2007;56,4,152-157
 - 27) Holeček V, Vlasák V, Rokyta R: Antioxidanty a jejich gastrointestinální adsorpce a interference jejich účinků, *Československá fyziologie* 2008 ;57,1.,24-32
 - 28) Holeček V. Volné radikály, antioxidanty a jak dále? *Klin. Biochem. Metab.*, 2006; 14 , 3, 140–145.
 - 29) Holeček V, Slípka J,Sobotová Š,Slouka D, Rokyta R: Volné radikály a antioxidanty v ORL *Československá fyziologie* 2008;4,116-122
 - 30) Hsiao PN, Chang MC, Cheng WF, Chen CA, Lin HW, Hsieh CY, Sun WZ. Morphine induces apoptosis of human endothelial cells through nitric oxide and reactive oxygen species pathways. *Toxicology*. 2009; 4;256(1-2):83-91
 - 31) Iqbal A, Ahmed A, Rudra A, Wankhede RG, Sengupta S, Das T, Roy D. Prophylactic granisetron vs pethidine for the prevention of postoperative shivering: a randomized control trial.*Indian J Anaesth.* 2009;53(3):330-4.
 - 32) Katz J: George Washington Crile , ano-asociación, an preceptivo analgesia, *Pain*, 1993;53,243-245
 - 33) Khan AU., Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 1994; 91 (26): 12365-12367
 - 34) Kim HK., Park SK., Zhou JL., Tagliatela G., Gung K., Coggeshall RE., Chung JM. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 2004; 111, 116-124
 - 35) Karbownik-Lewinska M., Kokoszko A., Józefiak M., Lewinski A. Significance of increased lipid peroxidation in critically ill patients. *Neuroendocrinology Letters* 2007; 28 (4): 367-381
 - 36) Kim HK., Kim JH., Gao X., Zhou JL., Lee I., Chung K., Gung JM. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain*, 2006; 122 (1-2): 53-

- 37) Kim SY., Lee SM., Park JW. Antioxidant enzyme inhibitors enhance singlet oxygen-induced cell death in HL-60 cells. *Free Radic. Res.* 2006; 40 (11): 1190-1197
- 38) Kirk GR., White J. Combined antioxidant therapy reduces pain and improves quality of life in chronic pancreatitis. *Gastrointestinal Surgery* 2006; 10 (4): 499-503
- 39) Knecht M.C. Wells, Lyons T.J., McCance D.R, Thorpe S.R., Baynes J.W., Age-dependent increase in ortho-tyrosine and metionine sulfoxide in human skin collagen is not accelerated in diabetes. Evidence against a generalized increase in oxidative stress indiabetes, *J. Clin. Invest.* 1997;100, 839- 846.
- 40) Koner B.C., Banerjee B.D., Ray A.: Effects of in vivo generation of oxygen free radicals on immune responsiveness in rabbits. *Immunol. Lett.* 1997; 59, 3, 127-131,
- 41) Kršiak, M. Opioidní analgetika: aktuální poznatky důležité pro léčení bolesti. *Postgrad Med*, 2004, 6, č. 5, s. 513–516.
- 42) Křikava K., Kalla K., Yamamotová A., Rokyta R. Blood serum changes in patients with pain during bone fractures and acute pancreatitis. *Neuroendocrinology Letters* 2004; 25 (1/2): 62-69
- 43) Lullmann H; Mohr K; Wehling M. *Farmakologie a toxikologie*. 1. čes. vyd. Praha : Grada, 2002; 308–323
- 44) Lushchak VI. Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. *Biochemistry (Mosc)* 2007; 72 (8): 809-827
- 45) McCord , JM Fridovich, I: The reduction of cytochrome c by mlk xantine oxidase. *J.Biol. Chem.* 1968; 243, 5753-5760
- 46) McCarty. M. F.: Oxidants downstream from superoxide inhibit nitric oxide production by vascular endothelium – a key role for selenium-dependent enzymes in vascular health. *Med. Hypotheses* 1999; 53, 4, 315 – 325
- 47) McCord , JM Fridovich, I.: Superoxid dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J.Biol.Chem.*, 1969; 244,6049-6055
- 48) Moore A, Edwards J, Barden J, et al. *Bandolier's Little book of pain.*, Oxford University Press, 2003; 453
- 49) Park ES., Gao X., Chung JM., Chung K. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. *Neurosci Lett.* 2006; 391 (3): 108-111
- 50) Pekárková I., Parara S., Holeček V., Stopka P., Trefil L., Racek J. Does exogenous melatonin influence the metabolism of free radicals and pain sensation in the rat? *Physiological Research* 2001; 50: 595-602
- 51) Peng KJ., Huang YS., An LN., Han XQ., Zhang JG., Wang QL., Sun J., Wang SR. Effect of ozone production from antibody catalyzed water oxidation on pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Biochim., Biophys. Sin. (Shanghai)* 2006; 38 (6): 417-422
- 52) Persson M, van der Linden J. Intraoperative field flooding with warm humidified CO2 may help to prevent adhesion formation after open surgery. *Med Hypotheses.* 2009 ;73(4):521-3.
- 53) Rokyta R., Holeček V., Pekárková I., Krejčová J., Racek J., Trefil L., Yamamotová A. Free radicals after painful stimulation are influenced by antioxidants and analgesics. *Neuroendocrinology Letters* 2003; 24, 5: 304-309

- 54) Rokyta R., Stopka P., Holeček V., Křikava K., Pekárková I. Direct measurement of free radicals in the brain cortex and the blood serum after nociceptive stimulation, *Neuroendocrinology Letters* 2004; 25 (4): 252-256
- 55) Rokyta R. et al, monografie Bolest, Tigris 2006; 77-97
- 56) Rutkow IM. Demographic and socioeconomic aspects of hernia repair in the United States in 2003. *Surg Clin North Am* 2003;83:1045-51
- 57) Seppi C, Castellana M, Minetti G., Piccinini G., Balduini C and Brovelli A., Evidence for membrane protein oxidation during in vivo aging of human erythrocytes, *Mech. Ageing Dev.* 1991;57,247-258.
- 58) Shao, L. E., Tanaka, T., Gribi, R., Yu, J.: Thioredoxin-related regulation of NO/NOS activities. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002; 962,140 – 150
- 59) Song XJ, Vizcarra C, Xu DS, Rupert RL, Wong ZN. Hyperalgesia and neural excitability following injuries to central and peripheral branches of axons and somata of dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 2003;89:2185-93.
- 60) Sies, H., Arteel, G. E.: Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000;28,10, 1451 – 1455
- 61) Stief TW. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med. Hypotheses* 2003; 60 (4): 567-572
- 62) Štípek Stanislav et al: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci , Grada, 2000
- 63) Štrosová M., Karlovská J., Balgavý P., Horáková L. Effect of some antioxidants on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity from rabbit skeletal muscle. *Neuroendocrinology Letters* 2006; 27 (2): 164-167
- 64) Tadao M., Yuji O. Role of free radicals in the development of severe acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 2004; 62 (11): 2015-2020
- 65) Tang YZ, Liu ZQ, Wu D. Lidocaine: an inhibitor in the free-radical-induced hemolysis of erythrocytes. *J Biochem Mol Toxicol.* 2009 ;23(2):81-6.
- 66) Terasako K, Yamamoto M. Comparison between pentazocine, pethidine and placebo in the treatment of postanesthetic shivering. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2000;44:311-312.
- 67) Vrba I, Rokyta R: Opioidy- mýty a skutečnost, *Vesmír* 2007;86,280-2
- 68) Wall PD: The prevention of postoperative pain, *Pain* 1988;33, 289-290
- 69) Weil JA., Bolton JR., Wertz JE. Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Practical Applications. In: J. Wiley and Sons, N. York 1994; 492-518
- 70) White PF, Kehlet H, Liu SS: Perioperative analgesia: What do we still know? *Anesth Analg* 2009; 108:1364 –7
- 71) Zaidi SM., Banu N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta* 2004;340, 229-233
- 72) Zimmermann M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16: 109-110

9. Seznam vlastních publikací

1. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

s impact factorem

The evaluation of nociceptive intensity by using free radicals, direct measurement by EPR method in the tail of anaesthetized rats

Richard Rokyta, Pavel Stopka, Eva Kafuňková, Jana Křížová, Jitka Fricová,
Neuroendocrinology Letters 2008;29(6), 1007-1014, IF: 1,404

The effect of laparotomy on hydroxyl radicals, singlet oxygen and antioxidants measured by EPR method in the tails of rats

Jitka Fricová, Pavel Stopka, Jana Krizova, Anna Yamamotova, Richard Rokyta
Neuroendocrinol Letters 2009; 30(3):1-000, 153-157, IF:1,359

The influence on postoperative analgesia by preemptive analgesia and its objective evaluation

Jitka Fricova, Martin Vejražka, Pavel Stopka, Jana Křížová, Jaromír Běláček, Richard Rokyta
Archives of Medical Sciences 2010; 6,5: In press, IF:1,012

bez impact faktoru

Léčba akutní pooperační bolesti -doporučený postup Společnosti anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny

Pavel Ševčík, Jiří Málek, David Bejšovec, Jitka Fricová, Tomáš Gabrhelík,
Jitka Fricová, Ivo Křikava, Jan Lejčko, Dušan Mach, Vladimír Mixa, Michaela Vojtíšková Bolest 2008;11,3

2. Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

bez IF

Bolest pacienta chronickou ránou Fricová J, Koutná M, Bolest 2010; 13,3, 128-134

Stimulace motorické mozkové kůry-nový pohled Masopust V, Ostrý S, Beneš V,
Fricová J, Bolest 2010;13,3, 135-139

Intranazální fentanyl-nová léková forma pro léčbu průlomové bolesti u onkologických pacientů
Fricová J, Remedia 2009;19,6,469-471

Postherpetická neuralgie Fricová J, Bolest 2009;12,3,144-145

Aplikace hyázy v léčbě pooperační epidurální fibrózy – review Masopust V, Häckel M, Fricová J, Bolest 2007; 10,4, 207-210

Videotorakoskopická hrudní sympatektomie v léčbě refrakterní anginy pectoris

Dobiáš M., Demeš R., Semrád M., Fricová J., Buncová M., Stříteský M. Bolest 2007;10, 1, 35-43

rTMS v léčbě bolesti Fricová J, Lékařské listy 2007;15,14, Příloha Zdravotnických novin 2007; 56, 35-36

Implantabilní intravenózní porty Fricová J, Stříteský M, Bolest 9, 3, 2006, 176-183

Implantabilní porty v léčbě chronické bolesti Fricová J, Stříteský M, Medical Tribune, 2006 ;II, 28

Port- nový trend v aplikaci léčiv Stříteský M, Fricová J, Jak na bolest, příloha časopisu Bolest určená pro pacienty, 2006, 42-50

Etika a léčba bolesti Fricova J, Postgraduální medicína 2005;4,7:příloha: Bolest pro praktické lékaře, 63-66

Etika a léčba bolesti Fricova J, Sanquis 2005;41,28-30

Léčba bolesti jako součást hojení ran Fricova J, Sestra 2005;11, Mimořádná příloha: Hojení ran, 6-7

Pooperační a poúrazová bolest Fricova J, Jak na bolest ,příloha časopisu Bolest určená pro pacienty 2005;1,24-29

3. Abstrakta

Refrakterní angina pectoris v ordinaci algeziologa

Fricova J Bolest 2010; 13, suppl 2, Československé dialogy o bolesti, Olomouc, 2010

rTMS jako neinvazivní neuromodulační metoda

Fricová J, Klírová M, Šoš P, Tišlerová B, Masopust V, Novák T, Rokyta
Bolest 2010; 13, suppl 2, Československé dialogy o bolesti, Olomouc, 2010

Repetitive transcranial stimulation in chronic orofacial neurogenic pain treatment

Fricová J, Klírová M, Šoš P, Tišlerová B, Häckel M, Masopust V, Novák T, Rokyta R, Congress on Pain, WIP, NY, 2009

Role of antioxidants on elevated hydroxyl radicals and singlet oxygen measured by EPR method in the tail of living rats

Fricova J, 6th Congress of IASP, EFIC Pain, Lisbon, Portugal, 2009

Repetitivní transkraniální magnetická stimulace v léčbě chronické bolesti

Fricová J, Šoš P, Tišlerová B, Häckel M, Masopust V, Novák T, Rokyta R, Bolest 2009;12, suppl 2, Československé dialogy o bolesti Brno, 2009

rTMS v léčbě neuropatické bolesti

Fricová J, Šoš P, Tišlerová B, Häckel M, Masopust V, Novák T, Rokyta R, Bolest 2009;12, 2. Neuromodulační den, Praha 2009

Polyneuropatie indukovaná chemoterapií

Fricová J, Bolest 2008;11, suppl 2, Československé dialogy o bolesti Nitra, 2008

Free radicals changes after surgical interventions with different types of premedications

Fricová J, Vejražka M, Stopka P, Krizova J, Rokyta R, 12th World Congress on Pain, Glasgow, 2008

The direct measurement of free radicals by using the EPR method for the evaluation of pain intensity

Rokyta R, Holeček V, Hálová J, Křížová E, Stopka P, Fricová J, Physiological Research, 2008; 57, 2

Repetitivní transkraniální magnetická stimulace rTMS v léčbě chronických bolestí

Rokyta R, Fricová J, Hackel M, Klířová M, Masopust V, Neradilek F, Bolest 2007; 10,4, 1. Neuromodulační den Praha, 2007

Změny volných radikálů u různých druhů premedikace u chirurgických výkonů

Fricová J, Vejražka M, Stopka P, Křížová J, Hálová J, Hrabánek J, Rokyta R, Bolest 2007; 10, suppl 2,

Československé dialogy o léčbě bolesti, Štrbské Pleso, 2007

Direct measurement of free radicals using the EPR method for the evaluation of nociception

Fricová J., Stopka P., Křížová E., Holeček V., Rokyta R. 3rd International Forum on pain Medicine, Montreal, 2007

Direct measurement of free radicals in the tail of anaesthetized rats by using the EPR method

Fricová J, Stopka P, Křížová E, Yamamotová A, Rokyta R, 5th congress of the European Federation of IASP Chapters (EFIC), Istanbul, Turkey, 2006

Naše zkušenosti s videotorakoskopickou sympatektomií v léčbě refrakterní anginy pectoris

Dobiáš M, Fricová J, Demeš R, Stříteský M, Buncová M, Bolest, 2006; 9, suppl 2 Československé dialogy o léčbě bolesti, České Budějovice, 2006

Endoscopic thoracic sympathectomy in the treatment of pain in patients with refractory angina

Stříteský M, Dobiáš M, Fricová J. 11th World congress on Pain, IASP, Sydney 2005

The possible use of implantable ports in the treatment of chronic pain

Fricová J., Stříteský M., 11th World congress on Pain, IASP, Sydney 2005

Biochemické změny u chronické bolesti u onkologických a neonkologických pacientů

Rokyta R, Yamamotová A, Fricová J, Haklová O., Bolest 2005;8, suppl 2, Československé dialogy o bolesti Bojnice, 2005

4. Kapitoly v monografiích

Praktický rádce pro onkologické pacienty Jana Karešová a kolektiv, Maxdorf, 2010

Fricová J, Stříteský M Když zlobí žíly, 44-70

Bolest a jak s ní zacházet Richard Rokyta a kolektiv, Grada, 2009

Akutní a chronická bolest 32-40

Bolesti hlavy 41-49,

Bolesti břicha 57-65,

rTMS 121-123,

Diagnostika a výhledy léčby bolesti 153-155,

Bolest: Rokyta R, Kršiak M, Kozák J, Tígis 2006

Fricová J, Šimek J: Etika a léčba bolesti, 35-40,

Fricová J, Stříteský M: Implantabilní porty v léčbě bolesti, 579-587